

Universität Bayreuth

**Molekularbiologische Gewinnung von *RNase* 40-124
Fragmenten zur Synthese von einheitlichen Glycoproteinen
durch native chemische Ligation**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von
Christian Piontek
aus Grub am Forst

Bayreuth, 2007

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie, Biologie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden im Zeitraum von September 2003 bis Juni 2007 am Lehrstuhl für Bioorganische Chemie der Universität Bayreuth unter der Leitung von Prof. Dr. Carlo Unverzagt durchgeführt.

Einreichung der Dissertation am:	14.11.2007
Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums:	14.03.2008

Prüfungsausschuss:

Erstgutachter:	Prof. Dr. C. Unverzagt
Zweitgutachter:	Prof. Dr. F. X. Schmid
Vorsitzender:	Prof. Dr. R. Schobert
	Prof. Dr. H.G. Alt

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	8
1.1. Bedeutung von glycosylierten Proteinen	8
1.2. Synthese von einheitlichen Glycoproteinen	9
1.3. Ligationsstrategien zur Synthese von Proteinen und Glycoproteinen	12
1.4. Proteinspleißen und Expressed Protein Ligation	16
1.5. Das IMPACT-TWIN-System	19
1.6. Bovine <i>RNase A-D</i>	20
2. Themenstellung	23
3. Syntheseplanung uniformer <i>Ribonuclease</i>	24
3.1. Bovine <i>RNase A</i>	24
3.2. Bovine <i>RNase C</i>	25
4. Materialien und Methoden	27
4.1. Materialien	27
4.1.1. Biochemikalien und Chemikalien	27
4.1.2. Proteine	28
4.1.3. Thioester	28
4.1.4. Puffer und Lösungen	28
4.1.5. Bakterienstamm und Medien	30
4.1.6. Verbrauchsmaterialien	30
4.1.7. Geräte	30
4.2. Methoden	31
4.2.1. Proteinchemische Methoden	32
4.2.1.1. Protein-Gelelektrophorese, SDS-PAGE	32
4.2.1.2. Expression des Fusionsproteins	33
4.2.1.3. <i>Inclusion Body</i> Präparation	33
4.2.1.4. Reduktion und Solubilisierung der <i>Inclusion Bodies</i>	34
4.2.1.5. Proteinbestimmung nach Bradford	34
4.2.1.6. Rückfaltung und Inteinspaltung	35
4.2.1.7. Modifikation des Fusionsproteins, Rückfaltung und Inteinspaltung	35
<i>Modifikation mit GSSG</i>	35
<i>Modifikation mit 3,3'-Dithiodipropionsäure</i>	36

	<i>Modifikation mit Methanthiosulfonsäure-S-methylester</i>	36
	<i>Modifikation mit 2-Carboxyethyl-methanthiosulfonat</i>	37
4.2.1.8.	Isolierung und Reinigung von <i>RNase</i> 40-124	37
4.2.1.9.	Synthese von Glycoproteinen durch native chemische Ligation	39
4.2.1.10.	Rückfaltung der synthetischen Enzyme	55
4.2.1.11.	Aktivitätstest der rückgefalteten Ligationsprodukte	55
4.2.1.12.	Bestimmung des Molekulargewichtes	56
5.	Ergebnisse und Diskussion	57
5.1.	Gewinnung von <i>RNase</i> 40-124	57
5.1.1.	Expression des Fusionsproteins und Lyse	57
5.1.2.	<i>Inclusion Body</i> Präparation und Denaturierung	58
5.1.3.	Rückfaltung und Inteinspaltung	60
5.1.4.	Modifikation des Fusionsproteins, Rückfaltung und Inteinspaltung	64
5.1.5.	Isolierung und Reinigung von <i>RNase</i> 40-124	71
5.2.	Synthese von Glycoproteinen durch native chemische Ligation	76
5.3.	Rückfaltung und Aktivitätstest der synthetischen Enzyme	118
6.	Zusammenfassung	124
7.	Summary	128
8.	Danksagung	132
9.	Literatur	134

Abkürzungsverzeichnis

A _p	Ampicillinresistenzgen
A _x	Absorption bei x Nanometer
Ac	Acetyl
Ampicillin	6-[D(-)-α-Aminophenylacetamido]-penicillansäure, Natriumsalz
AS	Aminosäure(n)
Asn	Asparagin
Asn34Pra	Aminosäureaustausch an Position 34 des Proteins von Asn zu Pra
amu	<i>atomic mass unit</i> (atomare Masseneinheit)
ber.	berechnet
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CBD	Chitin-bindende-Domäne
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CEMTS	2-Carboxyethyl-methanthiosulfonat
CMP	Cytidinmonophosphat
Complete	Complete Protease Inhibitor Cocktail
Da	Dalton
d	Tag(e)
dd	doppelt destiliert
DTE	1,4-Dithioerythrit
DTT	1,4-Dithiothreitol
DTDP	3,3'-Dithiodipropionsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Na ₂ EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Dinatriumsalz
EPO	Erythropoetin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	<i>electrospray ionisation mass spectrometry</i>
Et	Ethyl
Fuc	L-Fucose
g	Erdbeschleunigung
GdmCl	Guanidiniumchlorid
gef.	gefunden

Abkürzungsverzeichnis

GlcNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamin
GSH	Glutathion reduziert
GSSG	Glutathion oxidiert
h	Stunde(n)
HeptaAc	peracetyliertes Heptasaccharid
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IBs	<i>Inclusion Bodies</i>
IEP	Isoelektrischer Punkt
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	<i>Luria Bertani (broth)</i> , (Bezeichnung für Medium)
LC-MS	<i>liquid chromatography mass spectrometry</i>
LM	Lösungsmittel
mA	Milliampère
Mapoc	4-(Dimethyl)-aminophenacyloxycarbonyl
m	Masse
mAU	Milli-Absorptionseinheit
MCS	<i>multiple cloning site</i> (Mehrfachklonierungsstelle)
MESNA	2-Mercaptoethansulfonsäure, Natriumsalz
Met	Methionin
Met30Nle	Aminosäureaustausch an Position 30 des Proteins von Met zu Nle
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MMTS	Methyl-methanthiosulfonat (Methanthiosulfonsäure- <i>S</i> -methylester)
MPAA	<i>mercapto phenyl acetic acid</i> (Mercaptophenylelessigsäure)
MS	<i>mass spectrometry</i>
MW	<i>molecular weight</i> (Molekulargewicht)
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
n _{SG}	Anzahl an Schutzgruppen
NCL	native chemische Ligation
nm	Nanometer
NonaAc	peracetyliertes Nonasaccharid

Abkürzungsverzeichnis

OD _x	Optische Dichte bei x Nanometer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasenkettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pra	Propargylglycin
R _t	Retentionszeit
RNA	Ribonucleinsäure
<i>RNase</i>	<i>Ribonuclease</i>
RP	<i>reversed phase</i>
rpm	<i>revolution per minute</i>
RT	<i>room temperature</i> (Zimmertemperatur)
s	Sekunde
SCE	2-Carboxyethylthio-
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SG	Schutzgruppe
SSG	Cysteinmodifikation mit Glutathion
TCA	<i>trichloro acetic acid</i> (Trichloressigsäure)
TCEP	Tris-2-(carboxyethyl)-phosphin
Thz	1,3-Thiazolidin-4-carboxo
TOF	<i>time of flight</i>
Tricin	<i>N</i> -Tris-(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
ÜNK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
ZS	Zielsequenz

1. Einleitung

1.1. Bedeutung von glycosylierten Proteinen

Unter den bis heute bekannten posttranslationalen Modifikationen von Proteinen treten Glycosylierungen besonders häufig auf. Es wird angenommen, dass über 50 % aller menschlichen Proteine glycosyliert sind.^[1] Dabei übt der Kohlenhydratanteil einen erheblichen Einfluss auf die physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften des jeweiligen Proteins aus.^[2,3] Dies kann sich in einer veränderten biologischen Halbwertszeit bemerkbar machen, daneben kommt es zu einer größeren Wasserlöslichkeit und einer erhöhten thermischen bzw. proteolytischen Stabilität.^[4] Außerdem kann die Glycosylierung von Proteinen entscheidend für deren Expression und Faltung sein.^[5,6]

Die Funktionen von Glycoproteinen erstrecken sich über einen weiten Bereich. Glycoproteine spielen eine entscheidende Rolle bei molekularen Erkennungsvorgängen wie Zelladhäsion, Zelldifferenzierung oder Zellwachstum sowie bei der Wechselwirkung von Wirtszellen mit Pathogenen und der rezeptorvermittelten Endocytose.^[7,8] Weiterhin werden sie von der Qualitätskontrolle bei der Proteinfaltung im ER erkannt und dienen als Marker bei der nichtzellulären Immunantwort sowie bei der bakteriellen und viralen Infektion.^[9]

Auf molekularer Ebene ist der genaue Einfluss der Glycosylierung auf die Struktur und die Funktion von Proteinen in den meisten Fällen jedoch noch unklar. Da die Biosynthese von Glycoproteinen weder templatabhängig ist, noch unter direkter Transkriptionskontrolle steht, wird immer eine Mischung verschiedener Glycoformen synthetisiert, welche die gleiche Aminosäuresequenz besitzen, sich allerdings in Art, Position und Anzahl der Glycosylierungsstellen unterscheiden können.^[10] So wurden vom menschlichen CD59 Protein über 150 verschiedene Glycoformen gefunden.^[11] Das Glycosylierungsmuster ist dabei nicht nur vom Organismus, dem Zelltyp, der Spezifität sowie dem Expressionslevel diverser Enzyme der Glycosylierungsmaschinerie abhängig, sondern wird auch von der Zugänglichkeit und der lokalen dreidimensionalen Struktur des entstehenden Proteins bestimmt.^[7] Die Glycoproteine der Komplementkaskade werden fast alle in der Leber synthetisiert, dennoch unterscheiden sie sich erheblich in ihren Kohlenhydratanteilen.^[12] Zur Untersuchung von Glycoproteinen und deren biologischen Eigenschaften benötigt man ausreichende Mengen an homogenem Material. Die Isolierung von ausreichenden Mengen an einheitlichen Glycoproteinen ist wegen der Mikroheterogenität

mit den heute zur Verfügung stehenden Reinigungsverfahren kaum möglich.^[13] Die Entwicklung von neuen Methoden zur chemischen und enzymatischen Synthese von natürlichen, uniformen Glycoproteinen ist deshalb unerlässlich für systematische biologische und medizinische Studien oder therapeutische Ansätze.^[14]

1.2. Synthese von einheitlichen Glycoproteinen

Die Gewinnung von einheitlichen Glycoformen ist zu einem interdisziplinären Forschungsgebiet geworden. Die chemische Synthese bietet eine vielversprechende Alternative zu biologischen Methoden. Deshalb wurden verschiedene Ansätze entwickelt, die sich teilweise ergänzen und miteinander kombiniert werden können (vgl. Abbildung 1).

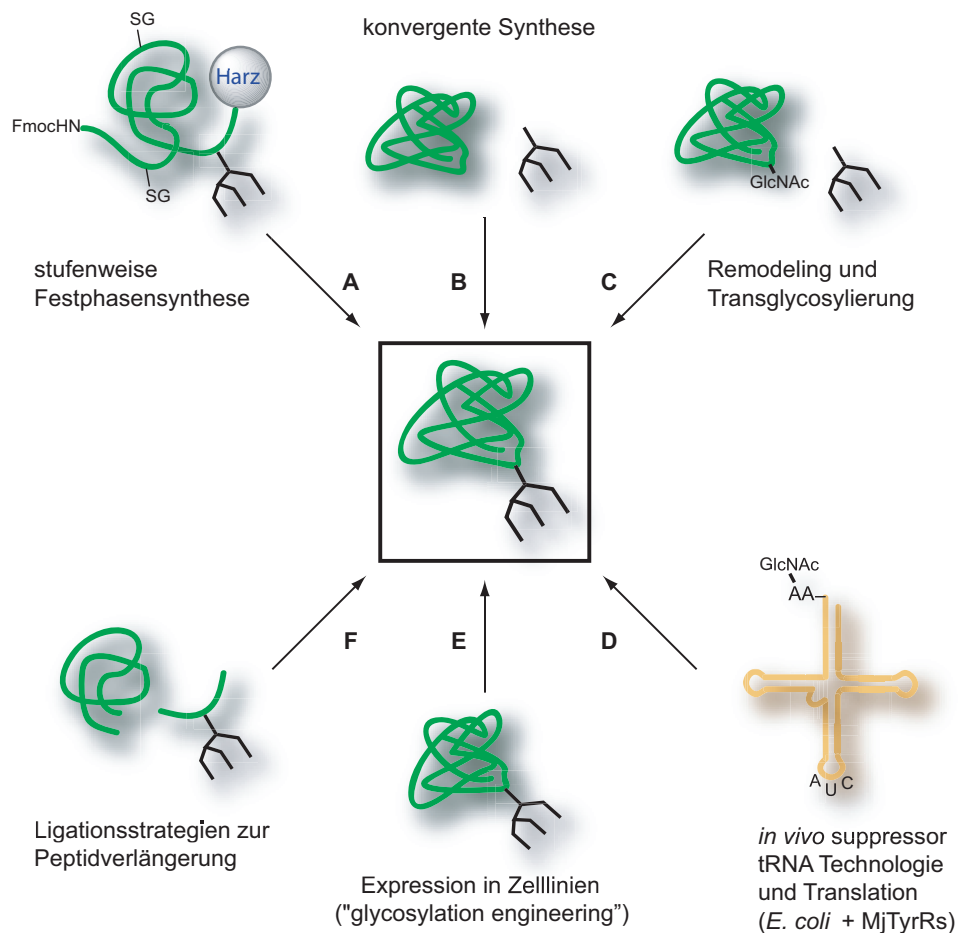


Abbildung 1. Möglichkeiten zur Gewinnung von einheitlichen Glycoproteinen

Bei der Festphasenglycopeptidsynthese wird während des Aufbaus der Aminosäuresequenz die entsprechende Zuckeramino-säure eingefügt. Dies ist meist nur für Peptide bis zu

ungefähr 60 Aminosäuren anwendbar, da es zur Aggregation und einer immer stärkeren Anhäufung von harzgebundenen Nebenprodukten kommen kann.^[15] Diese bestehen meist aus Fehlsequenzen und sind oftmals sehr schwer vom gewünschten Produkt abzutrennen. Alternativ kann die Zuckereinheit konvergent nach der Peptidsynthese gekoppelt werden.^[16] Diese Methode ist jedoch auf N-Glycopeptide beschränkt und erfordert die Schützung aller nichtbeteiligten, reaktiven funktionellen Gruppen. Diese Limitation kann durch die Synthese von Neoglycoproteinen umgangen werden. Dabei werden einmalig vorkommende funktionelle Gruppen unter Bildung einer unnatürlichen Protein-Zucker-Bindung über Oxime, Thioether, Disulfide oder Thioacetamide chemoselektiv miteinander verknüpft.^[17] Versuche, die Glycan-Peptid-Bindung enzymatisch mit Hilfe der Oligosaccharyltransferase aufzubauen, konnten nur in wenigen Fällen realisiert werden.^[18] Eine weitere Möglichkeit zur Synthese von einheitlichen Glycoproteinen stellt das Remodeling bzw. die Transglycosylierung dar. Dabei wird entweder ein Akzeptorpeptid mit einer AsnGlcNAc-Einheit durch Festphasensynthese hergestellt oder eine Mischung von isolierten Glycoformen durch den Einsatz von Endo- β -N-Acetylglucosaminidasen (ENGasen) vereinheitlicht. Diese Enzyme katalysieren die hydrolytische Spaltung der N,N'-Diacetylchitobiose-Einheit der Core-Struktur.^[19] Beim Remodeling wird die Zuckereinheit durch den Einsatz von spezifischen Glycosyltransferasen bis zum gewünschten Oligosaccharid verlängert, wobei jedoch nicht für alle Zuckerbausteine bzw. Verknüpfungsmöglichkeiten Transferasen zur Verfügung stehen.^[20,21] Bei der Transglycosylierung wird die Tatsache genutzt, dass ENGasen neben der Hydrolyse auch die regio- und stereospezifische Verknüpfung eines Oligosaccharids mit einem GlcNAc-Protein katalysieren.^[22] Speziell Endo-A und Endo-M wurden zur Synthese von Glycopeptiden verwendet,^[23,24] wobei eine erneute Hydrolyse des Produktes die Ausbeute limitieren kann. Eine weitere Alternative bietet die von Schultz *et al.* eingeführte Methode der Code-Erweiterung durch *in vivo* suppressor tRNA Technologie.^[25] Dabei wird ein orthogonales tRNA Synthetase-tRNA Paar aus *Methanococcus jannaschii* verwendet, das eine Amber-supressor tRNA_{CUA} mit einer glycosylierten Aminosäure beladen kann und diese damit direkt in ein Protein über ein zusätzliches TAG-Codon eingebaut wird. Zwar ist diese Methode bislang noch auf Monosaccharide beschränkt, durch Kombination mit Remodeling oder Transglycosylierung können jedoch größere Zucker erhalten werden. Die Expression von menschlichen Glycoproteinen in eukaryotischen Zellen ist der industriell genutzte Weg zu Glycoproteinen. Dabei werden in der Regel sehr komplexe Mischungen von Glycoproteinen erhalten. Die Produktion von EPO in Chinese Hamster

Ovary (CHO) Zellen ergab eine Proteinmischung mit 13 verschiedenen Glycosylierungsmustern. Durch ein „glycosylation engineering“ können zelluläre Glycosyltransferasen manipuliert und damit die Strukturen der Glycane verändert werden. Gerngross *et al.* konnten mit dieser Methode erstmals ein uniformes humanes Glycoprotein mit komplexem N-Glycan in mutierten Hefe Zelllinien exprimieren.^[26]

Die Verwendung von Ligationsstrategien kann ebenfalls zur Synthese von Glycoproteinen genutzt werden. Dabei werden kleinere Glycopeptidbausteine, die meist aus der Festphasenglycopeptidsynthese stammen, mit selektiven Ligationsmethoden zu größeren Proteinen verlängert (vgl. 1.3).^[27] Die zuvor erwähnten Größenprobleme der Festphasensynthese können so weitgehend umgangen werden.

Eine weitere Methode, die bislang allerdings keine allzu breite Anwendung fand, ist die Beeinflussung der Glycanstruktur durch Inhibierung von Enzymen, die in der Biosynthese von Glycoproteinen eine Rolle spielen. So hemmt beispielsweise der Glycosyltransferaseinhibitor Tunicamycin (Abbildung 2) die Synthese des lipidgebundenen Oligosaccharidvorläufers, der als Glycosyldonor bei der Bildung von N-Glycoproteinen verwendet wird.^[28]

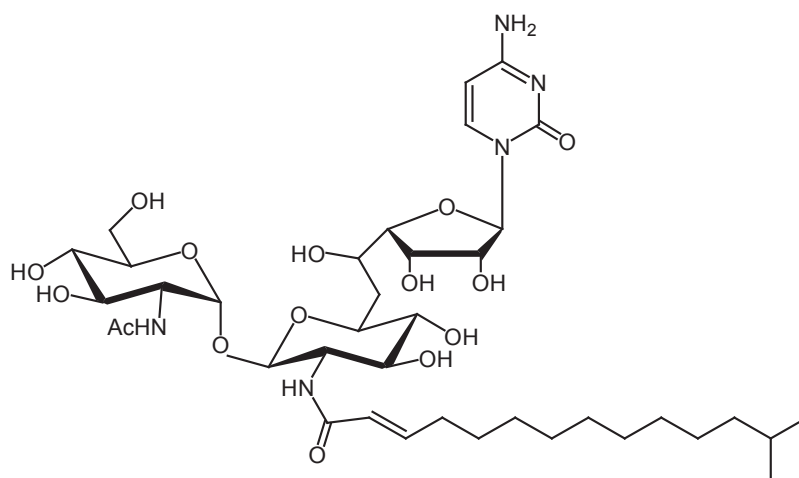


Abbildung 2. Tunicamycin

Als Resultat erhält man nur O-glycosylierte Proteine. Die Verwendung von Inhibitoren späterer Trimming-Glycosidasen resultiert in einer kleineren Bandbreite an N-Glycoformen, anstelle einer kompletten Eliminierung. So konnte bei Verwendung von N-Butyldesoxynojirimycin die Anzahl der Glycoformen beim HIV-Oberflächenprotein gp120 von 100 auf 3 verringert werden.^[29]

1.3. Ligationsstrategien zur Synthese von Glycoproteinen

Die chemische Ligation von ungeschützten Peptiden ist wohl die effizienteste Methode zur Synthese von Proteinen bzw. Glycoproteinen. Dabei wird die spezifische Reaktivität von funktionellen Gruppen genutzt, die sich orthogonal zu den restlichen reaktiven Stellen der Peptide verhalten und damit für eine chemoselektive Reaktion genutzt werden können. Es wurden verschiedenartige Strategien zur Verknüpfung von Peptiden entwickelt. Die hierzu verwendeten Bausteine stammen meist aus der Festphasenpeptidsynthese. Dabei wird im Allgemeinen eine künstliche, nicht amidische Bindung erzeugt. So wurden Thioester-, Thioether-, Oxim-, Thiazolidin- oder Triazolstrukturen zur Verknüpfung von Peptiden verwendet (Abbildung 3).^[30-34]

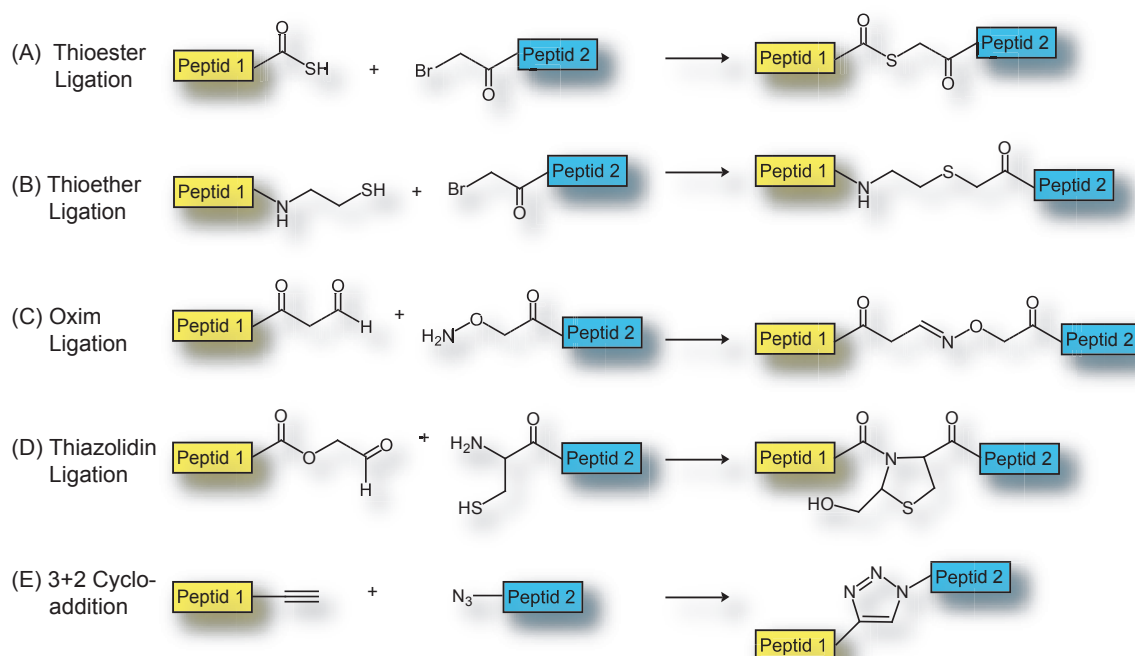


Abbildung 3. Chemoselektive Ligationsstrategien unter Bildung künstlicher Peptidverknüpfungen

Obwohl in vielen Arbeiten nachgewiesen wurde, dass diese nicht natürlichen Strukturen die funktionellen Eigenschaften der Proteine meist nur wenig verändern, ist die Verknüpfung über eine native Peptidbindung das bevorzugte Ziel einer Ligrationsreaktion. Durch die Entwicklung der nativen chemischen Ligation von Kent *et al.* konnte die Einschränkung auf künstliche Peptidverknüpfungen umgangen werden.^[35] Dabei führt die chemoselektive Reaktion von einem C-terminalen Thioester und einem Peptid mit einem

N-terminalen Cystein zur Ausbildung einer nativen Amidbindung. Der erste Schritt besteht aus einer reversiblen Umesterungsreaktion der Thiolgruppe des N-terminalen Cysteins mit dem C-terminalen Thioester. Durch die räumlich begünstigte Zwischenstufe schließt sich ein irreversibler, intramolekularer S,N-Acylshift unter Ausbildung der thermodynamisch stabilen Amidbindung an (vgl. Abbildung 4), wobei so gut wie keine Racemisierung auftritt.^[36]

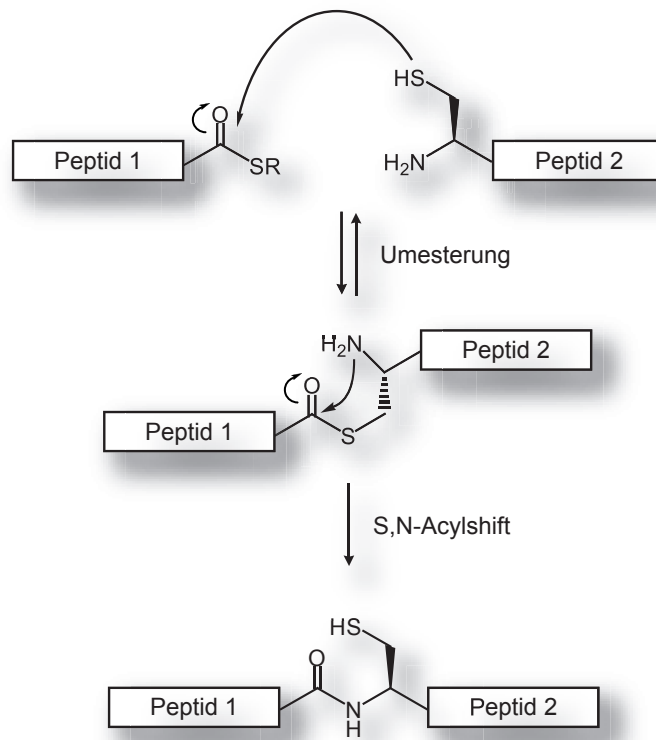


Abbildung 4. Mechanismus der nativen chemischen Ligation

Wie andere Ligationsmethoden auch, kann die native chemische Ligation ohne Verwendung von Schutzgruppen in wässriger Lösung durchgeführt werden. Da die Umesterung im ersten Schritt reversibel ist, sind interne Cysteine in beiden Peptidsegmenten in den meisten Fällen nicht störend. Die milden Reaktionsbedingungen sind auch im Hinblick auf die Synthese von Glycoproteinen vorteilhaft.

Eine Erweiterung der NCL ist die sog. sequentielle native chemische Ligation, wodurch die Verknüpfung von drei oder mehr Peptiden möglich wird.^[37] Dabei besitzen die mittleren Segmente neben einer C-terminalen Thioestereinheit auch ein N-terminales Cystein. Dieses kann z.B. als 1,3-Thiazolidin-4-carboxo (Thz)-Einheit maskiert werden. Nach der ersten Ligation kann das Cystein freigesetzt werden und steht für eine zweite Ligation mit einem weiteren C-terminalen Thioester zur Verfügung. Als alternative Schutzgruppe für

das N-terminale Cystein des inneren Segments kann auch der photolabile 4-(Dimethylamino)phenacyloxycarbonyl (Mapoc)-Rest verwendet werden.^[38] Dieser kann nach dem ersten Ligationsschritt durch UV-Bestrahlung abgespalten werden.

Eine interessante Variante der sequentiellen NCL stellt die kinetisch kontrollierte NCL dar.^[39] Hierbei wird die höhere Reaktivität von Arylthioestern im Vergleich zu Alkylthioestern ausgenutzt. So kann ein Segment mit ungeschütztem N-terminalen Cystein und einem unreaktiven Alkylthioester mit einem Segment mit C-terminalem Arylthioester reagieren, ohne dass Nebenreaktionen wie Cyclisierung oder Polymerisation auftreten.

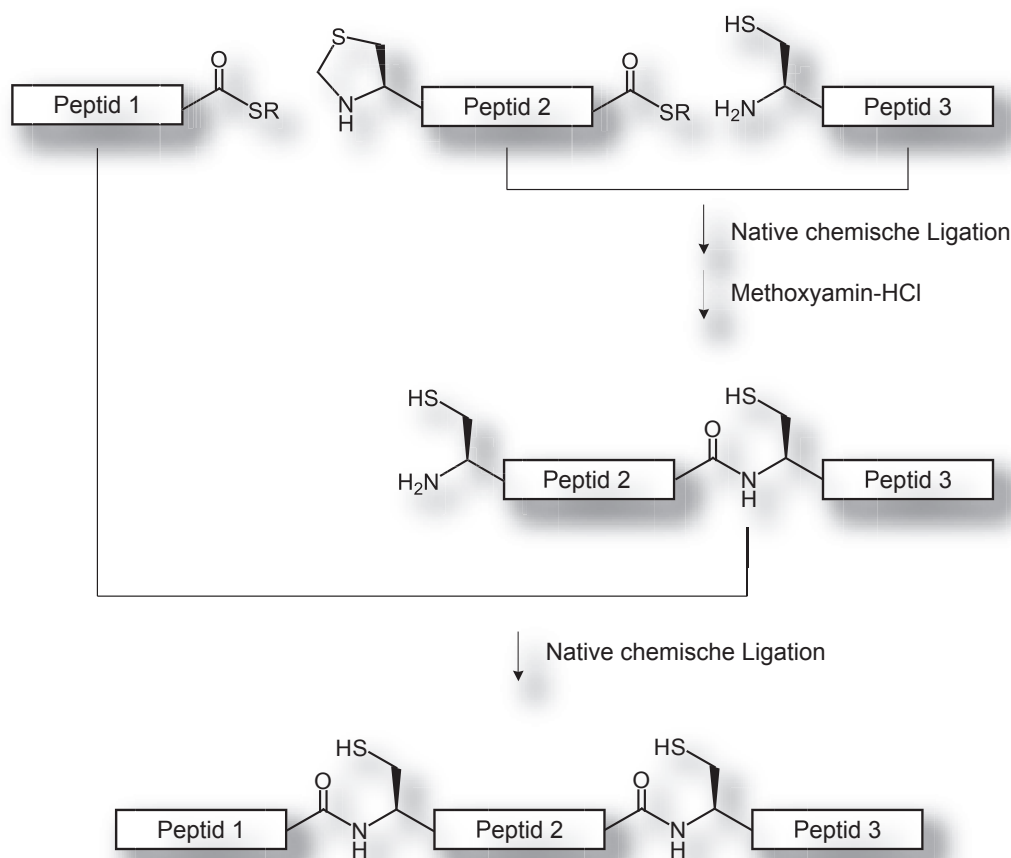


Abbildung 5. *Sequentielle native chemische Ligation*

Während am C-Terminus bis auf gewisse Ausnahmen wie Ile, Val, Pro^[40] sowie Asp und Glu^[41] sämtliche Aminosäuren als Thioester eingesetzt werden können, ist das niedrige natürliche Vorkommen von Cystein (ca. 1.7 %) eine Einschränkung der NCL. Die einfachste Lösung ist das Einbauen zusätzlicher Cysteine in die Proteinsequenz bei der Festphasensynthese oder durch ortsgerichtete Mutagenese, was allerdings Struktur und Funktion des Proteins beeinflussen kann. Aus diesem Grund sind eine Reihe von cysteinfreien Ligationstechniken entwickelt worden. Eine Möglichkeit stellt die

Verwendung von Auxiliaren dar. Dabei handelt es sich um Thiol-Hilfsgruppen (vgl. Abbildung 6) am N-Terminus, die nach der Ligation wieder abgespalten werden können.

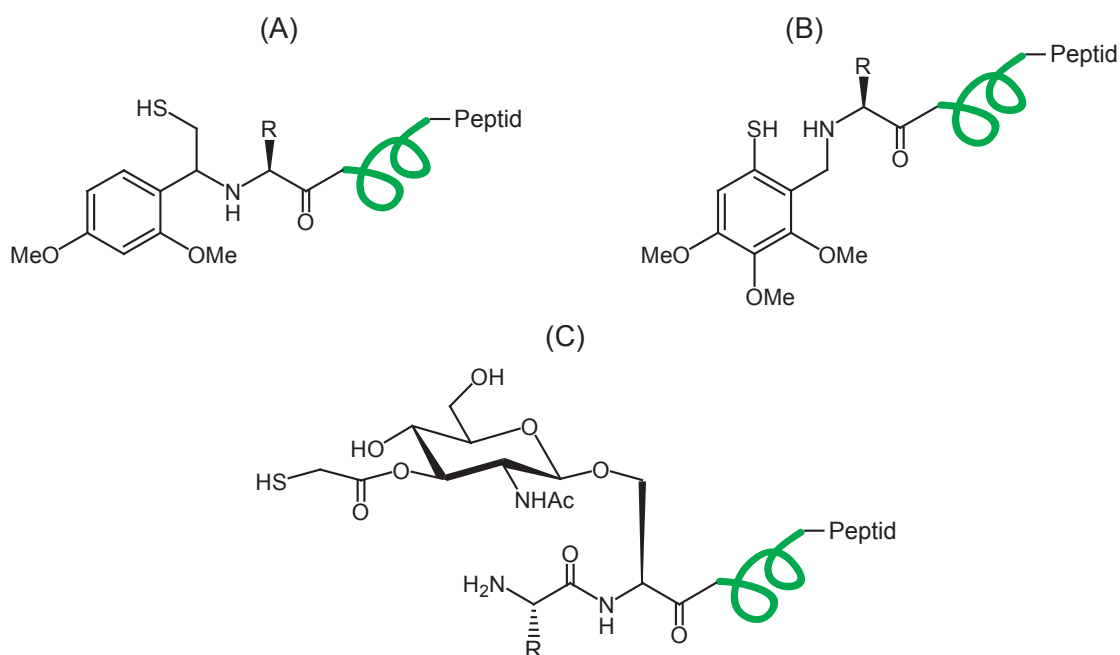


Abbildung 6. Auxiliare für die cysteinefreie Ligation

Die häufigste Anwendung fanden dabei die 1-(2,4-Dimethoxy)aryl-2-mercaptoethyl-Hilfsgruppe (A) sowie die 4,5,6-Trimethoxy-2-mercaptobenzyl-Hilfsgruppe (B), welche beide mittels Trifluoressigsäure entfernt werden können.^[42,43] Interessant ist die kürzlich von Wong *et al.* eingeführte zuckervermittelte Peptidverknüpfung. Diese erfolgt wahrscheinlich über einen 14-gliedrigen cyclischen Übergangszustand, wobei der als Hilfsgruppe verwendete Sulfanylacetylrest nach der Ligation mit DTT und Hydrazin abgespalten werden kann.^[44] Die nachträgliche Alkylierung des Cysteins an der Ligationsstelle mit Bromessigsäure zu einem pseudo-Glutamat oder die Entschwefelung mit Raney-Nickel zu einem Alanin sind weitere Möglichkeiten einer cysteinefreien Ligation.^[45,46] Durch Verwendung eines reaktiveren Selenocysteins für die Ligation ist eine Selektivität gegenüber anderen im Protein vorkommenden Cysteinen möglich.^[47] Die seit 1919 bekannte Staudinger-Reaktion findet in neuerer Zeit ebenfalls Anwendung in der Proteinsynthese. Hierbei reagiert ein C-terminaler Phosphinothioester mit einem N-terminalen Azid unter Bildung einer nativen Peptidbindung.^[48,49]

1.4. Proteinspleißen und Expressed Protein Ligation

Selbst durch die Verwendung von verschiedenen Ligationsstrategien und deren Tandemvariationen stellte die Synthese von Proteinen mit mehr als 200 Aminosäuren weiterhin eine grosse Herausforderung dar. Dieses Problem wurde gelöst, in dem man die

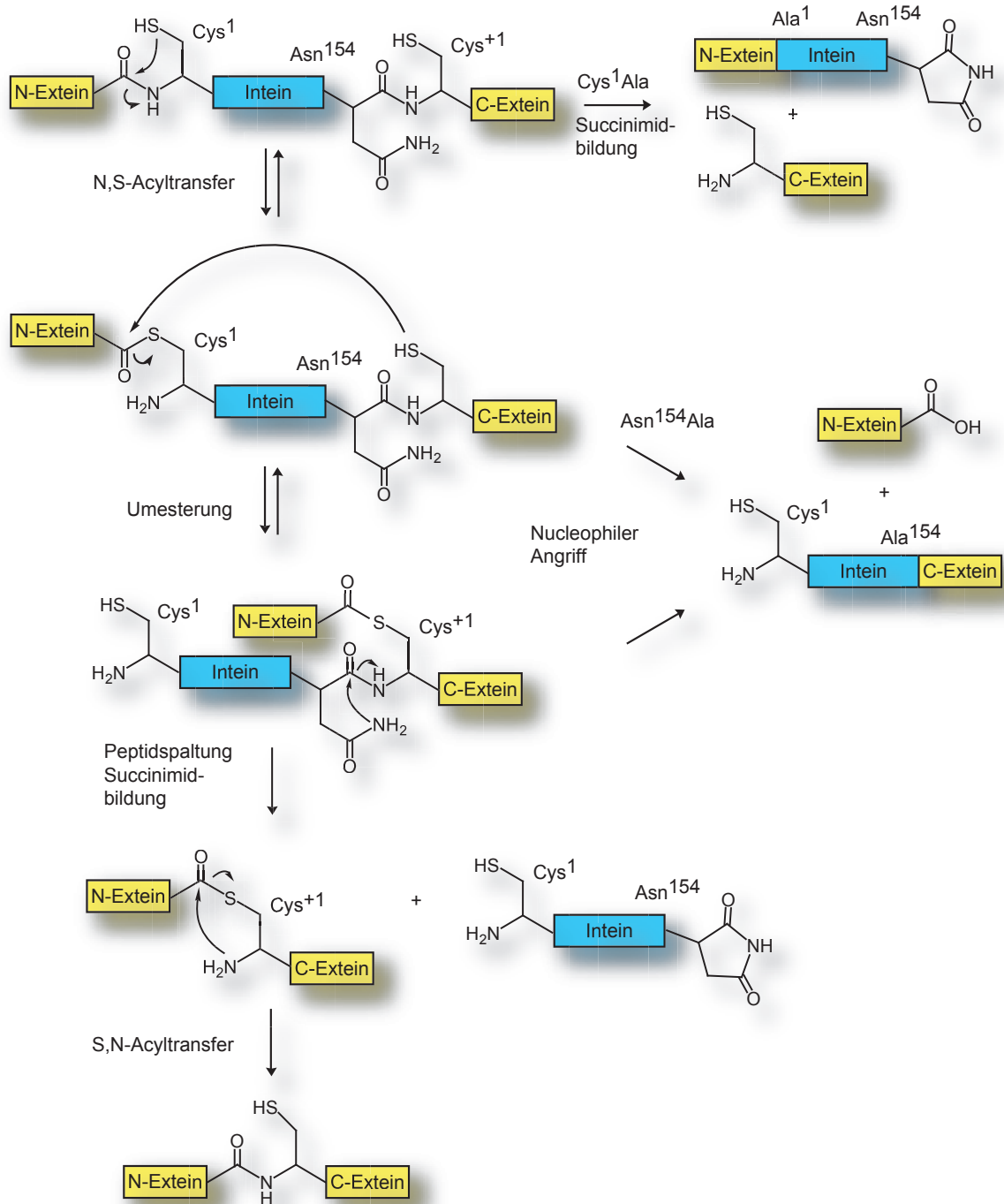


Abbildung 7. Spleiß- und Spaltmechanismus für das Ssp Dna B Mini-Intein

lange Zeit unabhängigen Gebiete der Protein-Semisynthese mit dem sog. Proteinspleißen kombinieren konnte, einem Phänomen, das erstmals 1990 zeitgleich von 2 Arbeitsgruppen an der vakuolären ATPase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Sce VMA) beobachtet wurde.^[50] Beim Proteinspleißen handelt sich um einen posttranslationalen Prozeß, bei dem aus einem Vorläuferprotein autokatalytisch eine interne Proteinsequenz entfernt wird und die beiden flankierenden Bereiche unter Bildung einer neuen Peptidbindung miteinander verknüpft werden. Dabei wird die interne Sequenz als Intein und die externe Sequenz als Extein bezeichnet,^[51] in Anlehnung an die Termini Intron und Exon. Beim RNA-Spleißen sind sog. Spleißosomen als Katalysatoren notwendig,^[52] wogegen das Proteinspleißen nach einem intramolekularen Mechanismus ohne exogene Cofaktoren abläuft.^[53] Die Aufklärung des Mechanismus des Proteinspleißens gelang mit Hilfe von *in-vitro*-Spleißsystemen sowie durch Mutagenesestudien und war eng mit der Mechanismusaufklärung der nativen chemischen Ligation verbunden.^[54] Proteinspleißen beinhaltet vier gekoppelte nucleophile Substitutionen (vgl. Abbildung 7).^[55] Der Vorgang beginnt durch den Angriff einer aktivierten Thiol- oder Hydroxylgruppe der Seitenkette von Cystein bzw. Serin am N-Terminus des Inteins auf die N-terminal benachbarte Carbonylgruppe. Im Anschluss kommt es durch eine Umesterungsreaktion zu einem verzweigten Zwischenprodukt mit zwei N-Termini. Dessen Bildung wird durch die Tertiärstruktur des Inteins begünstigt, die N- und C-Extein in räumliche Nähe zueinander bringt. Im dritten Schritt erfolgt die Cyclisierung des C-terminalen Asparagins, wodurch das Intein freigesetzt wird. Dieser Schritt ist im Gegensatz zu den beiden vorherigen irreversibel. Durch eine abschließende X,N-Acylwanderung werden beide Exteine über eine neue Peptidbindung miteinander verknüpft. Der gesamte Spleißprozeß beinhaltet also die Spaltung von zwei Peptidbindungen sowie die Bildung einer neuen Peptidbindung.

Die bisher über 200 bekannten Inteine zeigen eine starke Konservierung spezieller Aminosäuren. Fast alle Inteine beginnen mit Serin oder Cystein. Die wenigen Ausnahmen besitzen ein Alanin am N-Terminus, weswegen es hier zu einem direkten nucleophilen Angriff des C-Exteins kommt.^[56] Weiterhin weisen die meisten Inteine am C-Terminus eine Triade aus His-Asn-(Cys/Ser/Thr) auf, wobei auch Inteine mit Glutamin bekannt sind. Zusätzlich sind im N-terminalen Spleißbereich oftmals die Aminosäuren Threonin und Histidin konserviert, welche an der Spleißreaktion beteiligt sind. Die Mehrheit der Inteine sind bifunktionelle Proteine, die zusätzlich eine Homing-Endonuclease-Aktivität besitzen.^[57] Fehlt diese Endonucleaseregion, spricht man von einem Mini-Intein.

Durch Austausch der direkt am Spalten und Knüpfen von Peptidbindungen beteiligten Aminosäuren ist es möglich, jeden Schritt des Spleißvorgangs gezielt zu kontrollieren und unabhängig voneinander ablaufen zu lassen. So bildet sich der durch die N,S-Acylwanderung entstehende Thioester auch dann, wenn die weiteren Schritte durch Aminosäuremutationen blockiert sind (Fehlen der Cyclisierungsmöglichkeit des C-terminalen Asparagins durch Alaninaustausch).^[58] Die Synthese eines C-terminalen Thioesters ist somit durch thiolinduzierbare Spaltung eines Zielproteins möglich, das an den N-Terminus eines modifizierten Inteins fusioniert wurde.^[59] Andererseits ist die Asn-Cyclisierung und damit die Freisetzung des C-Exteins auch ohne die vorhergehende Umesterungsreaktionen des Spleißmechanismus möglich, was durch eine Mutation des N-terminalen Nucleophils im Intein zu Alanin erreicht werden kann. Wird ein Zielprotein mit seinem N-Terminus an den C-Terminus eines solchen Inteins fusioniert, so ist die Synthese des Zielproteins mit einer beliebigen N-terminalen Aminosäure möglich, wie zum Beispiel Cystein.^[60] Somit können speziell solche Bausteine bereitgestellt werden, die für die native chemische Ligation (vgl. 1.3) benötigt werden. Die dadurch neu entstandene Methode der Proteinsynthese wurde als „expressed protein ligation“ (EPL) bezeichnet.^[61] Die bis dahin bestehenden Grenzen der Festphasensynthese, lange Peptide herzustellen, konnten damit umgangen werden, da auf diese Weise prinzipiell die Synthese von Fragmenten unbegrenzter Größe mit weitaus geringerem Zeit- und Kostenaufwand möglich ist. So wurde mit Hilfe der EPL ein 1407 AS großes Analogon der β -Untereinheit der *E. coli* RNA-Polymerase hergestellt.^[62] Außerdem ist neben der Verwendung eines Intein-Systems zur Zeit keine Alternative bekannt, ein Polypeptid mit C-terminalem Thioester auf molekularbiologischem Weg herzustellen. Zur Freisetzung von N-terminalen Cysteinen gibt es einige alternative Verfahren, wie die Spaltung von Met-Vorläuferproteinen mit endogener Methionin-Aminopeptidase oder Bromcyan^[63,64] oder den Verdau mit Proteasen, wie Faktor Xa oder TEV, von Proteinen, die eine entsprechende Signalsequenz enthalten.^[65,66] Allerdings können hierbei Probleme wie unspezifische Spaltungen oder Aggregation des Zielproteins unter den benötigten Bedingungen auftreten.

Die EPL hat das Repertoire zur Bestimmung von Struktur, Funktion, Lokalisation und Wechselwirkung von Proteinen enorm bereichert. So wurden Proteine mit Fluoreszenzlabel,^[67] segmentweiser Isotopenmarkierung^[68] oder posttranslationalen Modifikationen^[69] synthetisiert. Weiterhin wurde sie zur Cyclisierung^[70] oder zur Einführung unnatürlicher Aminosäuren verwendet.^[71]

1.5. Das IMPACT-TWIN-System

Zur Reinigung von rekombinanten Proteinen werden oftmals Affinitätstags verwendet. Da diese häufig mit der Struktur und der Aktivität des Zielproteins interferieren, müssen sie nach der Reinigung z.B. durch Proteasen wieder abgespalten werden, was einen Zusatzschritt zur Abtrennung des Affinitätsmarkers und der Protease bedeutet. Dies kann umgangen werden, wenn zwischen dem Affinitätstag und dem Zielprotein zusätzlich ein Intein fusioniert wird, dessen Abspaltung induziert werden kann.^[72] Dies wird beim IMPACT-TWIN (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag-Two Intein), einem neuen Proteinexpressions- und Reinigungssystem von New England Biolabs, ausgenutzt.^[73] Der kommerziell erhältliche Expressionsvektor pTWIN1 besteht aus 7375 Basenpaaren und enthält zur Selektion von transformierten Bakterien ein Resistenzgen für die periplasmatische β -Lactamase, was zu einer Ampicillinresistenz führt.

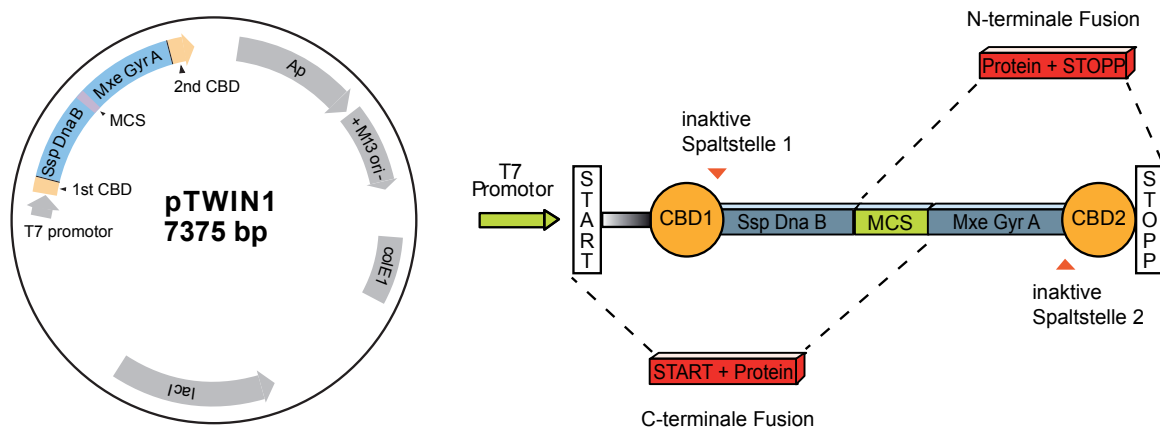


Abbildung 8. Schematische Darstellung des pTWIN1-Vektors und Funktionsprinzip des IMPACT-TWIN-Systems

Als Affinitätsmarker enthält der Vektor Sequenzen für zwei Chitin-bindende-Domänen aus dem *Chitinase A1* Gen von *Bacillus circulans* WL-12, die aus 51 bzw. 52 Aminosäuren bestehen.^[74] Weiterhin sind auf dem Vektor zwei modifizierte Inteine codiert. Zum Einen handelt es sich um das 154 Aminosäuren große Mini-Intein Ssp Dna B aus *Synechocystis Spp.*^[75], zum Anderen um das Mxe GyrA-Intein aus *Mycobacterium xenopi*, das 198 Aminosäuren beinhaltet.^[76] Zwischen beiden Inteinen befindet sich eine Mehrfachklonierungsstelle (MCS), in die, unter Verwendung geeigneter Restriktionsenzyme und einer Ligase, die Insertion des gewünschten Zielgens ins Leseraster möglich ist. Die Fusion

des Zielproteins ist dabei entweder mit seinem N- oder C-Terminus an eines der beiden Inteine möglich (N- und C-terminale Fusion, vgl. Abbildung 8). Dadurch kann ein Fusionsprotein bestehend aus Met-Zielsequenz-Mxe Gyr A-CBD2 oder CBD1-Ssp Dna B-Zielsequenz exprimiert werden. Die Transkription der entsprechenden Gene steht unter der Kontrolle des induzierbaren T7-Promotors.^[77] In Abwesenheit von IPTG ist die Expression durch Bindung des *lac*-Repressors an die *lac*-Operon Sequenz stark unterdrückt.

Um die ungewollte Spaltung zwischen den Chitin-bindenden-Domänen und den Inteinen zu verhindern, wurden die Inteine modifiziert und die entsprechenden Spaltstellen inaktiviert (vgl. Abbildung 7). So wurde beim Ssp Dna B-Intein das N-terminale Cys¹ gegen ein Ala ersetzt, wodurch die ersten beiden Umesterungsreaktionen des Spleißmechanismus blockiert sind, es aber weiterhin zu einer Cyclisierung des C-terminalen Asn¹⁵⁴ kommen kann (vgl. 1.4). Die dabei resultierende Freisetzung des Zielproteins mit einem vorher festgelegten, frei wählbaren N-Terminus, ist pH- und temperaturabhängig.^[78] In der Sequenz des Mxe GyrA-Inteins wurde das C-terminale Asn¹⁹⁸ gegen ein Ala ersetzt. Somit besteht die Möglichkeit einer thiolinduzierbaren Spaltung am N-Terminus des Inteins, wobei die Spaltung am C-Terminus durch die nicht mögliche Succinimidbildung des Asn unterdrückt ist.^[79] Auf diese Weise kann ein C-terminaler Thioester gewonnen werden. Die generelle Vorgehensweise ist bei der N- und C-terminalen Fusion identisch. Nach Expression und Lyse wird der lösliche Rohextrakt auf eine Chitinsäule gegeben und sämtliche Fremdproteine werden durch gründliches Waschen entfernt. Anschließend wird auf der Säule die Spaltung zwischen Intein und Zielprotein induziert (durch Thiolzugabe bzw. pH- und Temperaturänderung) und es kann das gewünschte Protein eluiert werden. Im Vergleich zu anderen Affinitätsstrategien, die exogene proteolytische Spaltung sowie die Entfernung der Protease und des Affinitätstags beinhalten, ist im Idealfall nur ein einziger Chromatographieschritt zur Isolierung des reinen Zielproteins notwendig.

1.6. Bovine *RNase A-D*

Bei der bovinen *Ribonuclease* handelt es sich um ein Verdauungsenzym des Pankreas. Sie tritt als eine Mischung von 4 Isoenzymen auf, die als *RNase A-D* bezeichnet werden.^[80] Die Primärstruktur ist bei allen Varianten identisch und besteht aus einer einzelnen Peptidkette von 124 Aminosäuren (Abbildung 9).

H₂N-Lys-Glu-Thr-Ala-Ala-Ala-Lys-Phe-Glu-Arg-Gln-His-Met-Asp-Ser-Ser-Thr-Ser-Ala-Ala-Ser-Ser-Ser-Asn-Tyr-Cys-Asn-Gln-Met-Met-Lys-Ser-Arg-**Asn**-Leu-Thr-Lys-Asp-Arg-Cys-Lys-Pro-Val-Asn-Thr-Phe-Val-His-Glu-Ser-Leu-Ala-Asp-Val-Gln-Ala-Val-Cys-Ser-Gln-Lys-Asn-Val-Ala-Cys-Lys-Asn-Gly-Gln-Thr-Asn-Cys-Tyr-Gln-Ser-Tyr-Ser-Thr-Met-Ser-Ile-Thr-Asp-Cys-Arg-Glu-Thr-Gly-Ser-Ser-Lys-Tyr-Pro-Asn-Cys-Ala-Tyr-Lys-Thr-Thr-Gln-Ala-Asn-Lys-His-Ile-Ile-Val-Ala-Cys-Glu-Gly-Asn-Pro-Tyr-Val-Pro-Val-His-Phe-Asp-Ala-Ser-Val-OH

Abbildung 9. Aminosäuresequenz von RNase mit Glycosylierungsstelle an Asparagin 34

In der Sekundärstruktur bilden sich 4 Disulfidbrücken aus (vgl. Abbildung 10), die einen entscheidenden Teil zur Stabilität der nativen Form beitragen. Weiterhin besitzt die RNase vier Prolinreste, von denen im nativen Zustand zwei in der cis-Form (Tyr92/Pro93 und Asn113/Pro114) und zwei in der trans-Form (Lys41/Pro42 und Val116/Pro117) vorliegen.

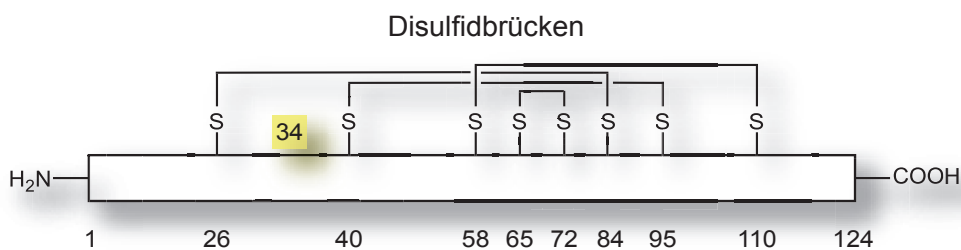


Abbildung 10. Bovine RNase mit Disulfidmuster und Glycosylierungsstelle

RNase A ist ein unmodifiziertes Enzym, während RNase B, C und D am Asparagin 34 eine Glycosylierung in der Consensus-Sequenz Asn-Leu-Thr besitzen. RNase B besteht aus fünf Hauptglycoformen, die am Stickstoffatom der Seitenkette von Asn34 ein verzweigtes N-Glycan des Oligomannosidtyps (Man₅₋₉GlcNAc₂) tragen.^[81] Der variable Mannoseanteil besteht zu ungefähr 60 % aus Man₅ und zu 30 % aus Man₆.^[82] Das Glycosylierungsmuster der seltener vorkommenden RNase C und D entspricht dem komplexen biantennären Typ bzw. einer heterogenen Mischung. Neben zwei bis drei Mannoseeinheiten treten zwei zusätzliche GlcNAc-, eine Fucose-, zwei Galactose- sowie zwei bis vier N-Acetylneuraminsäureeinheiten auf (Abbildung 11).^[83]

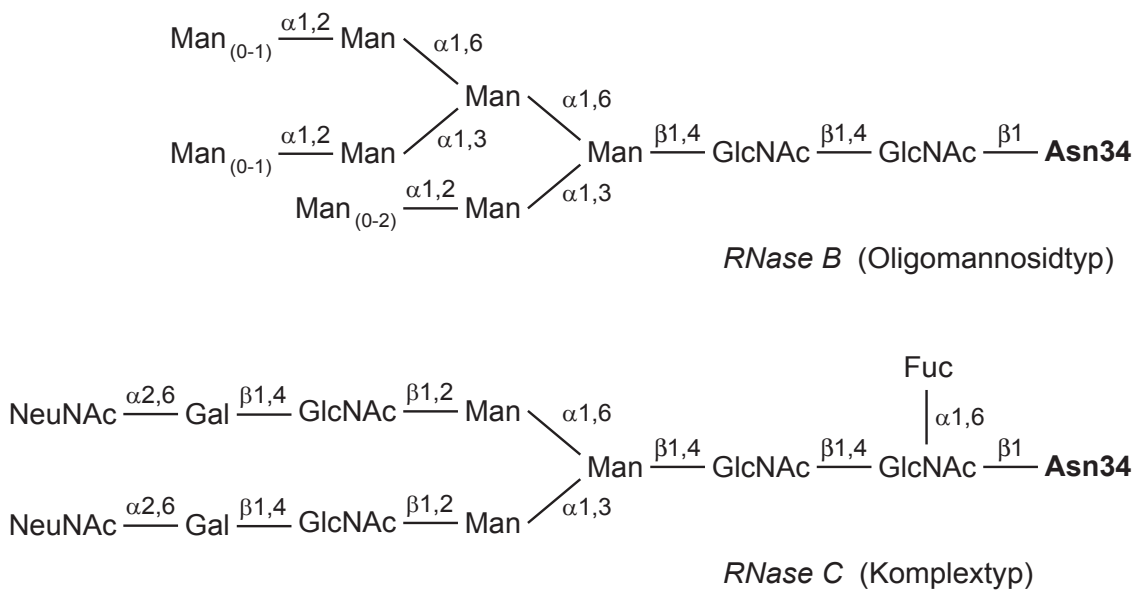


Abbildung 11. *N*-Glycane an Asn34 von boviner *RNase B* und *C*

Bei der *RNase* handelt es sich um eine Endonuclease, die den hydrolytischen Verdau von RNA unter Spaltung der Phosphor-5'-Sauerstoffbindung katalysiert, bevorzugt nach Pyrimidinbasen (U,C).^[84] Entscheidend an der Katalyse beteiligt sind die Histidine 12 und 119.^[85] Dabei fungiert der Imidazolring von His 12 als Base, der ein Proton vom 2'-Sauerstoff des Substrats abstrahiert und dadurch den Angriff auf das Phosphoratom erleichtert. Die Seitenkette von His 119 fungiert als Säure, wobei sie den 5'-Sauerstoff protoniert und damit den Austritt beschleunigt. Die Aminosäuren Lys 41 und Phe 120 sind ebenfalls am Katalysemechanismus beteiligt, indem sie den Übergangszustand mit einem pentavalent koordinierten Phosphoratom stabilisieren.^[86]

Die *RNase* ist das am intensivsten untersuchte Enzym des 20. Jahrhunderts,^[87] was sie zu einem interessanten Modellsystem z.B. für das Studium der Glycoproteinsynthese macht. *RNase A* wurde schon vor über 60 Jahren erstmals kristallisiert^[88] und war das erste Enzym, dessen komplette Aminosäuresequenz aufgeklärt werden konnte.^[89] Die Synthese von *RNase A* gelang bereits in Lösung^[90], an der Festphase^[91], durch enzymatische Fragmentkondensation^[92] und durch native chemische Ligation.^[93] Verschiedene Formen von *RNase B* mit Sialyl Lewis X Motiven konnten durch den Einsatz von Endoglycosidase H und speziellen Glycosyltransferasen hergestellt werden.^[94] Der Einfluss des Kohlenhydratanteils auf Parameter wie Faltung, proteolytische Zugänglichkeit oder physikalische Eigenschaften lässt sich bei den verschiedenen Formen der *RNase* besonders

gut untersuchen, da die 3D-Strukturen mit Ausnahme des Zuckerteils identisch sind^[95] und die Isolierung von *RNase B* mit verschiedener Anzahl an Mannoseeinheiten möglich ist.^[96] So gelang es mit Hilfe der Kapillar-Elektrophorese erstmals bei der *RNase B*, einheitliche Glycoformen in geringen Mengen zu isolieren und den Einfluss des Kohlenhydratanteils auf die dynamische Stabilität und enzymatische Aktivität des Proteins nachzuweisen.^[97]

2. Themenstellung

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von Methoden zur Synthese einheitlicher Glycoproteine. Dabei sollten festphasenchemisch gewonnene Glycopeptidthioester und molekularbiologisch gewonnene Fragmente mit Hilfe der nativen chemischen Ligation zu uniformen Glycoproteinen verknüpft werden. Studien zur Funktion von Glycoproteinen in biochemischen Systemen sollten durch die Bereitstellung von homogenem Material im Milligrammmaßstab deutlich erleichtert werden. Bedingt durch die schwierige Isolierung einheitlicher Glycoproteine aus natürlichen Quellen (Mikroheterogenität), ist die Synthese solcher Proteine in den letzten Jahren zu einem interessanten Forschungsgebiet geworden. So ist es für genaue Untersuchungen der biologischen Aktivität sowie von Struktur-Wirkungsanalysen unerlässlich, ausreichende Mengen an einheitlichen Glycoproteinen zur Verfügung zu haben.

Es sollte das Fragment der bovinen *RNase* 40-124 **B** mit einem N-terminalen Cystein mit Hilfe eines Inteinsystems gewonnen werden. Dieses Fragment sollte zur Untersuchung und Optimierung von Ligationsbedingungen mit dem Thioester Met-*RNase* 1-39 **A** bzw. dem glycosylierten Thioester *RNase* 1-39 **C** verwendet werden. Mit Hilfe eines Enzymassays sollte die Rückfaltung zum nativen Enzym untersucht werden.

3. Syntheseplanung uniformen *Ribonuclease*

3.1. Bovine *RNase A*

Die Synthese von einheitlichen Glycoproteinen sollte mit Hilfe der nativen chemischen Ligation realisiert werden. Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen sollte dabei zunächst die nicht glycosylierte *RNase A* als Modellsystem dienen. Dazu wurde das Protein in die Fragmente Met-*RNase* 1-39 **A** und *RNase* 40-124 **B** geteilt. Beide Segmente sollten mit Hilfe des dualen Vektorsystems pTWIN1 hergestellt werden. Fragment **B** sollte dabei durch Expression in einem bereits vorhandenen *E. coli* Klon mit dem Vektor pTWIN^{cp1} gewonnen werden.

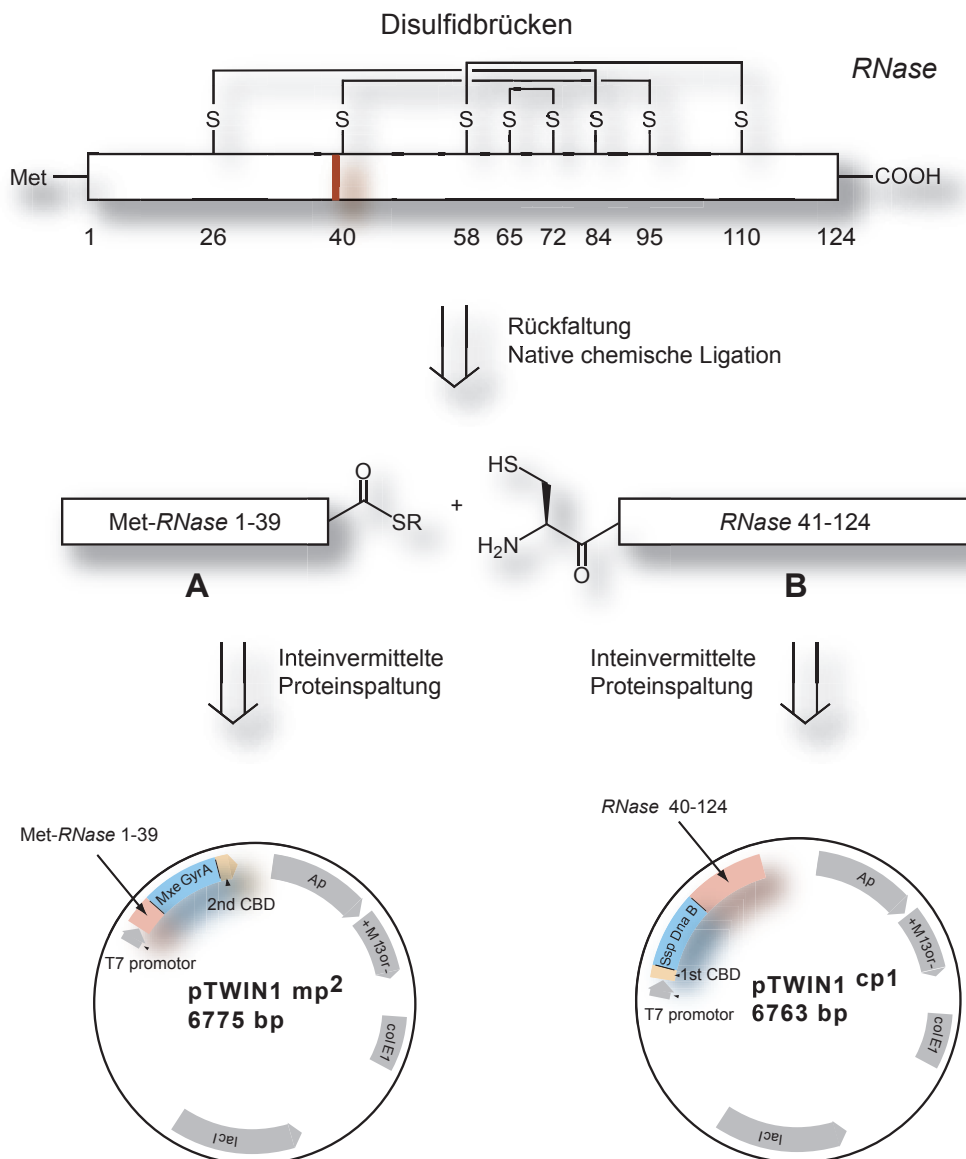


Abbildung 12. Retrosynthese für bovine *RNase*

Die Möglichkeiten zur Isolierung und Reinigung des Fragmentes *RNase* 40-124 **B** aus *Inclusion Bodies* sollten verbessert werden. Nach Verknüpfung der Fragmente **A** und **B** sollte das Ligationsprodukt Met-*RNase* 1-124 rückgefaltet und mit Hilfe eines Assays (Hydrolyse von cyclischem 2',3'-CMP) die enzymatische Aktivität nachgewiesen werden.

3.2. Bovine *RNase C*

Zur Synthese von glycosylierter *RNase C* 1-124 sollte eine analoge Zwei-Segment-Strategie wie zur Synthese von Met-*RNase* 1-124 verwendet werden. Dazu wurde das Protein in die Fragmente *RNase* 1-39 **C** mit komplexem N-Glycan am Asparagin 34 und *RNase* 40-124 **B** geteilt. Mit Hilfe der nativen chemischen Ligation sollte die glycosylierte *RNase C* 1-124 gewonnen werden (Abbildung 13 a). Der Aufbau von kürzeren Peptiden mit komplexem N-Glycan wie Baustein **C** gelingt am Besten mit Hilfe der Festphasenglycopeptidsynthese. Allerdings kam es nach Einführung des glycosylierten Aminosäurebausteins zu einer deutlichen Abnahme der Kopplungseffizienz bei den nachfolgenden Schritten. Eine effektive Synthese des benötigten glycosylierten Fragments *RNase* 1-39 **C** konnte deshalb bisher nicht realisiert werden. Einen Ausweg ermöglichte die Tatsache, dass sich an Position 26 der Aminosäuresequenz ein weiteres Cystein befindet, was für eine Drei-Segment-Strategie durch sequentielle native chemische Ligation genutzt werden sollte. Zur Synthese von *RNase C* 1-124 wurde diese deshalb in die Segmente *RNase* 40-124 **B**, *RNase* 26-39 **D** und *RNase* 1-25 **F** unterteilt (Abbildung 13 b). Dabei sollten die Segmente **D** und **F** durch Festphasensynthese gewonnen werden. Segment **B** sollte durch Inteinvermittelte Proteinspaltung erhalten werden (vgl. 3.1). Eine zentrale Aufgabe sollte dabei Segment **D** erfüllen. Dieses trägt neben dem komplexen N-Glycan am Asparagin 34 beide für die native chemische Ligation benötigten funktionellen Gruppen, also einen Thioester am C-Terminus und ein N-terminales Cystein. Das Cystein sollte in Form eines Thiazolidinringes maskiert werden, um unkontrollierte Polymerisation bzw. Cyclisierung zu verhindern. In der ersten Ligation sollten die Segmente **B** und **D** miteinander verknüpft werden. Durch Öffnung des Thiazolidinringes sollte das Fragment *RNase* 26-124 **E** mit N-terminalem Cystein gewonnen werden. Durch anschließende Ligation mit dem Segment *RNase* 1-25 **F** sollte schließlich die vollständige *RNase C* 1-124 mit komplexem N-Glycan am Asparagin 34 erhalten werden. Als Alternative sollte eine Variante des Segments *RNase* 26-39 **D** verwendet werden, das anstelle des

Thiazolidinringes die photolabile Mapoc-Schutzgruppe trägt. Das Volllängenprotein sollte rückgefaltet und die Aktivität mit Hilfe eines Enzymassays untersucht werden.

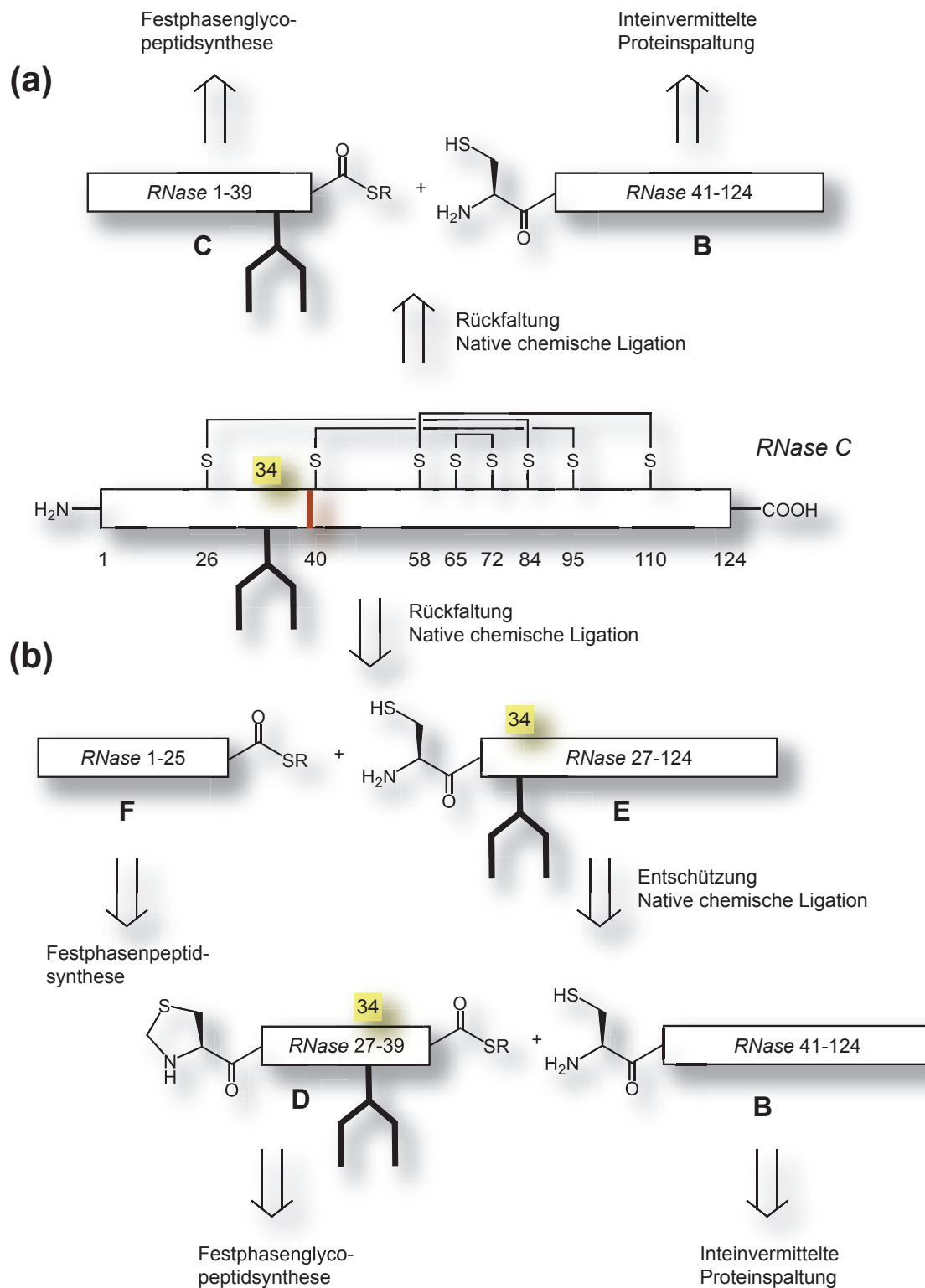


Abbildung 13. Zwei- (a) und Drei-Segment-Strategie (b) zur Synthese für bovine *RNase C*

4. Materialien und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Biochemikalien und Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Biochemikalien werden von folgenden Firmen bezogen:

Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland):	Acetonitril für HPLC
Fluka/Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland):	L-Arginin, cyclisches 2',3'-CMP, 3,3'-Dithiodipropionsäure, Methanthiosulfonsäure-S-methylester, O-Methylhydroxylamin Hydrochlorid MPAA, Na ₂ HPO ₄ , TCEP, Thiophenol
Merck (Darmstadt, Deutschland):	Ameisensäure für HPLC
MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland):	Proteinmolekulargewichtsstandard (14.4- 116 kDa)
NuSep (Frenchs Forest, Australien):	10 x SDS-Tris-Tricin Laufpuffer, 2x SDS-Tris-Tricin Probenpuffer
Peq-Lab (Erlangen, Deutschland):	IPTG
Roche (Mannheim, Deutschland):	Complete Protease Inhibitor Cocktail
Roth (Karlsruhe, Deutschland):	Ampicillin-Natriumsalz, Brilliant Blau (Coomassie) R 250, Hefeextrakt, EDTA, Glutathion reduziert/oxidiert, Guani- diniumchlorid, Natriumchlorid, PMSF, Roti-Quant Proteinbestimmung, TCA 20 % ige Lösung, Tris, Tris-HCl, Trypton/Pepton aus Casein
Serva (Heidelberg, Deutschland):	Desoxycholat
Toronto Research Chemicals (Toronto, Kanada):	2-Carboxyethyl-methanthiosulfonat

4.1.2. Proteine

Folgende Enzyme und Proteine kommen zum Einsatz:

Fluka/Sigma-Aldrich

(Taufkirchen, Deutschland): BSA (66.4 kDa), Lysozym (14 kDa), *RNase A* (13.6 kDa)

4.1.3. Thioester

Olaf Harjes (Diplomarbeit),

Nelson Lombana (Promotion),

Markus Püttner (Promotion): Thioester Met-*RNase* 1-39

Manuela Schaffrath (Promotion): Thioester *RNase* 1-39, Asn34(Ac₃GlcNAc)

Stefano Mezzato (Promotion): Thioester *RNase* 30-39, Asn34HeptaAc

Claudia Pöhner (Promotion): Thioester *RNase* Thz-26-39, [Asn34Pra]

Christian Heinlein (Promotion): Thioester *RNase* Thz-26-39, Asn34GlcNAc, [Met30Nle, Met31Nle]

Daniel Varón Silva (Promotion): Thioester *RNase* 1-25
Thioester *RNase* AcThz-26-39, Asn34NonaAc
Thioester *RNase* Thz-26-39, Asn34Nona
Thioester *RNase* Mapoc-26-39, Asn34Nona
Thioester *RNase* Thz-26-39, Asn34Nona, [Met30Nle, Met31Nle]

4.1.4. Puffer und Lösungen

Alle Lösungen werden, soweit nicht anders angegeben, mit dd-H₂O angesetzt. Lösungen, die für die Arbeit mit Bakterienkulturen verwendet werden sollen, werden autoklaviert oder sterilfiltriert (Porengröße: 0.2 µm). Das Einstellen des pH-Wertes erfolgt mit 1 N Salzsäure und 1 N Natronlauge. Die pH-Werte verstehen sich, soweit nicht anders angegeben, bei einer Temperatur von 25 °C.

Ampicillin-Stammlösung: 150 mg/ml, sterilfiltriert

IPTG-Stammlösung: 1 M, sterilfiltriert

10x Laufpuffer für 10-20 % ige

NuSep-Gele : 61 g Tris, 90 g Tricin, 5 g SDS ad 1 l dd-H₂O

Fixierlösung für SDS-Polyacrylamidgele: 20 % ige (w/v) TCA

Färbelösung für SDS-Polyacrylamidgele: 50 % iges (v/v) MeOH, 10 % ige (v/v) Essigsäure, 0.1 % iges (w/v) Brillant Blau R 250

Entfärbelösung für SDS-

Polyacrylamidgele: 10 % ige (v/v) Essigsäure, 5 % iges (v/v) MeOH

Lysepuffer (Puffer B1): 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 20 µM PMSF, 0.1 mM TCEP, pH 8.5

Waschpuffer (*Inclusion Bodies*) : 1 mg/ml Desoxycholat, 2 mM EDTA, 0.2 mg/ml Lysozym (erster Schritt), pH 8.5

Reduktionspuffer (*Inclusion Bodies*) : 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 20 µM PMSF, 0.1 mM TCEP, 100 mM DTT, pH 8.0

Denaturierungslösung : 6 M GdmCl, 2 mM EDTA, 1 mM TCEP, pH 8.0.

Rückfaltungspuffer 1: 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 20 µM PMSF, 500 mM L-Arginin, 1 mM TCEP, pH 7.4

Rückfaltungspuffer 2: 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 20 µM PMSF, 500 mM L-Arginin, pH 7.4

Ligationspuffer 1: 100 mM Na₂HPO₄, 6 M GdmCl, 3 % (v/v) Thiophenol, pH 7.0

Ligationspuffer 2: 100 mM Na₂HPO₄, 6 M GdmCl, 2 mM EDTA, 30 mM TCEP, 3 % (v/v) Thiophenol, pH 7.0

Ligationspuffer 3: 100 mM Na₂HPO₄, 6 M GdmCl, 2 mM EDTA, 30 mM TCEP, 200 mM MPAA, pH 7.0

Abspaltungspuffer

(Thiazolidin) : 100 mM Na₂HPO₄, 6 M GdmCl, 2 mM EDTA, 30 mM TCEP, 200 mM Methoxyamin, pH 2.0

Denaturierungspuffer (Ligationen): 6 M GdmCl, 0.1 M Tris, 2 mM EDTA, 0.2 M GSH, pH 8.5

Rückfaltungsgspuffer (Ligationen): 0.1 M Tris, 2 mM EDTA, 0.3 mM GSSG, pH 8.5

Puffer für Enzymassay: 50 mM NaCacodylat, 0.3 mg/ml c-2',3'-CMP

4.1.5. Bakterienstamm und Medien

Bakterienstamm:

Genotyp:

E. coli K12 (B ER2566)

F, *fhuA2*[Ion], *ompT*, *lacZ*::T7gene, *gal*, *sulA11*, Δ (*mcrC-mrr*)114::IS10, R(*mcr-73*::miniTn10)2R(*zgb-210*::Tn10)1 (TetS), *endA1* [*dcm*].

Medium (*Luria Bertani Broth*)^[98]:

10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl ad 1 Liter dd-H₂O, pH 7.0

Alle Nährmedien, Glasgeräte, Pipettenspitzen und Eppendorfggefäße werden vor ihrer Benutzung durch Autoklavieren (20 min, 121 °C, 0.2 MPa) sterilisiert, hitzelabile Lösungen wie Antibiotika und IPTG werden sterilfiltriert und nachträglich hinzugefügt. Zum LB-Flüssigmedium wird erst unmittelbar vor Benutzung Ampicillin in einer Endkonzentration von 150 µg/ml hinzugegeben.

4.1.6. Verbrauchsmaterialien

Brand (Wertheim, Deutschland):

Polystyrol-Halbmikroküvetten

Millipore (Bedford, USA):

Centriplus YM-3 Zentrifugationseinheiten,
Microcon YM-3 Zentrifugationseinheiten,
Nitrocellulosefilter 0.025 µm

NuSep

(Frenchs Forest, Australien):

Tris-Tricin Fertiggele (Gradientengele 10-20%)

Chromatographie Zubehör Trott

(Kriftel, Deutschland):

Schraubkappen PP 8-425, 1 ml konische Glass-
vials mit Schraubgewinde

4.1.7. Geräte

Agilent Technologies

(Böblingen, Deutschland):

XDB-C8 5 µm Säule (150 x 2.1 mm)

Alaris (Baesweiler, Deutschland):

AsenaTM GS-Spritzenpumpe

Analytik Jena (Jena, Deutschland):

UV/VIS-Spektralphotometer Specord 200

COY Laboratory Products Inc.

(Michigan, USA):

Aerobe glove box, Modell B

Eppendorf (Hamburg, Deutschland):

Thermomixer compact, Zentrifuge 5417R

GE Healthcare (Uppsala, Schweden):

Spannungsquelle für die Elektrophorese EPS 601, UV-Spektralphotometer Ultrospec 1000, Äkta Basic, Superdex Peptide PE (300x7.5)

Hanna Instruments

(Kehl am Rhein, Deutschland):

pH-Messgerät HI 9321

Hewlett-Packard

(Waldbronn, Deutschland):

UV/VIS-Dioden Array Spektrometer 8452A

H+P Labortechnik

(Oberschleißheim, Deutschland):

Varioklav Dampfsterilisator 25 T

Kendro (Newton, USA)

Sorvall RC-5B Zentrifuge

LTF Labortechnik

(Wasserburg, Deutschland):

Geldokumentation

Mettler Toledo (Gießen, Deutschland):

Analysenwaage AX105, Laborwaage PE3600

Microfluidics Corporation

(Newton, USA):

Microfluidizer M110-L

Micromass (Cray, USA):

LCT ESI-TOF-Massenspektrometer

New Brunswick Scientific

(Edison, USA):

Inkubator Innova 4230

Philips (Hamburg, Deutschland):

HP(L) Mitteldruckbrenner, 120 Watt

Thermo Electron Corporation

(Fernwald, Deutschland):

Vakuumkonzentrator RC 10.10 m,
Deepfreezer VX 690

Universitätswerkstatt

(Bayreuth, Deutschland):

Elektrophoresekammer für Proteingele

YMC (Schermbeck, Deutschland):

YMC-Pack ODS-A S-3 µm (100x2.0 mm)
für die LC-MS

4.2. Methoden

Zentrifugationen von Proben in Reaktionsgefäßen werden, wenn nicht anders angegeben, in einer Tischzentrifuge 5417R von Eppendorf bei 13000 rpm durchgeführt. Daneben steht für das Zentrifugieren von größeren Volumina eine Sorvall RC-5B Kühlzentrifuge

(3000–12000 rpm) zur Verfügung, die mit einem SLA-1500 bzw. SS 34 Rotor betrieben wird. Alle Zentrifugationsschritte werden, sofern nicht anders angemerkt, bei 4 °C durchgeführt. Lösungen von Proteinen oder Peptiden werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wird das Lösungsmittel durch Anlegen eines Hochvakuums bei 0.1 mbar im Vakuumkonzentrator RC 10.10 bis zur Trockne eingedampft.

Bestimmungen der optischen Dichte von Bakterienkulturen erfolgen mit einem UV-Spektralphotometer Ultrospec 1000 bei 600 nm (OD_{600}) in Polystyrol Halbmikroküvetten ($d = 1$ cm). Als Referenz wird reines LB-Medium verwendet.

4.2.1. Proteinchemische Methoden

4.2.1.1. Protein-Gelelektrophorese, SDS-PAGE

Die Trennung von Proteinen wird durchgeführt nach der Methode von *Schägger und Jagow*.^[99] Es werden kommerziell erworbene Tris-Tricin-Gele mit einem Acrylamidgradienten von 10-20 % von NuSep verwendet. Der entsprechende Lauf- und Auftragspuffer wird nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Vor dem Auftragen werden flüssige Proben jeweils mit dem gleichen Volumen 2x Proteinauftragspuffer versetzt und 10 min bei 95 °C inkubiert. Bakterienpellets oder eingedampfte Proben werden mit 20 µl 2x Proteinauftragspuffer und 20 µl dd-H₂O versetzt und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Sämtliche Proben werden vor dem Auftragen auf das Gel 1 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Vom Überstand werden 40 µl, vom Proteinstandard, der vorher 10 min bei 95 °C inkubiert wird, 10 µl auf das SDS-Gel aufgetragen. Proben, die größere Konzentrationen an GdmCl (> 0.5 M) enthalten, werden vor dem Auftragen 40 min bei RT auf einem Nitrocellulosefilter (Porengröße 0.025 µm) entsalzt. Als Laufpuffer für die Gele dient eine 2x Tris-Tricin-SDS-Lösung. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgt in einer vertikalen Apparatur bei konstanter Spannung von 150 V und einer anfänglichen Stromstärke von 60 mA, die nach 80 min Laufzeit auf ca. 20 mA abfällt. Das Gel wird 5 min in 20 % iger TCA fixiert und anschließend 2 h unter leichtem Schütteln in 50 % igem (v/v) MeOH, 10 % iger (v/v) Essigsäure, 0.1 % igem (w/v) Brilliant Blau gefärbt. Das Entfärben der Gelmatrix erfolgt 6 Stunden in 10 % iger (v/v) Essigsäure, 5 % igem (v/v) MeOH, bis die blaugefärbten Proteinbanden vor dem entfärbten Hintergrund detektierbar werden.

4.2.1.2. Expression des Fusionsproteins

Zu 5 ml LB-Medium werden 30 µl der Glycerinkultur des gewünschten Klons gegeben und 10 h bei 215 rpm und 36 °C inkubiert. Anschließend werden 4 ml dieser Suspension entnommen und damit eine 100 ml Kultur angeimpft und diese für 14 h bei 36 °C, 150 rpm inkubiert. Daraufhin werden von dieser Kultur zweimal 35 ml entnommen und jeweils 2.5 Liter frisches LB-Medium angeimpft. Die optische Dichte bei 600 nm in den neuen Kulturen soll nach dem Animpfen jeweils 0.1 betragen. Alle LB-Medien enthalten Ampicillin in einer Endkonzentration von 150 µg/ml. Die 2.5 Liter-Kulturen werden im Anschluss bei 36 °C und 115 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 inkubiert. Von dieser Suspension wird ein Aliquot (100 µl) als Referenz vor der Induktion für eine spätere SDS-PAGE entnommen und bei -80 °C gelagert. Die Expression des Fusionsproteins wird durch Zugabe von je 1.875 ml 1 M IPTG-Lösung (0.75 mM IPTG Endkonzentration) zur Bakterienkultur induziert und es wird weitere 3 h bei 36 °C unter Schütteln (110 rpm) inkubiert. Diese optimierten Expressionsbedingungen wurden bereits in vorhergehenden Arbeiten ermittelt. Die Bakterien der IPTG-induzierten Kultur werden bei 4 °C und 10000 rpm (Sorvall RC-5B Kühlzentrifuge, SLA-1500-Rotor) 15 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in insgesamt 60 ml Lysepuffer B1 bei 4 °C langsam resuspendiert und die Lösungen vereinigt. Von dieser Lösung wird ein Aliquot (100 µl) für eine spätere SDS-PAGE entnommen und bei -80 °C aufbewahrt. Anschließend werden unlösliche Bestandteile durch ein Sieb filtriert. Die so vorbereitete Bakterienlösung wird mittels Microfluidizer unter ständiger Eiskühlung aufgeschlossen. Es wird einmal mit 30 ml und einmal mit 20 ml Lysepuffer B1 nachgewaschen und die Lösung in einem eisgekühlten Glasbehälter aufgefangen. Von der Suspension wird ein Aliquot entnommen und anschließend das Lysat 15 min bei 10000 rpm und 4 °C zentrifugiert und vom Überstand erneut ein Aliquot (100 µl) entnommen. Die Suspensionen vor der Lyse sowie der Überstand und die Suspension des Lysates werden per SDS-PAGE (vgl. 4.2.1.1) mit einem Proteinstandard (Protein Molecular Weight Marker, Fermentas: 14.4-116 kDa) untersucht.

4.2.1.3. Inclusion Body Präparation

Das Pellet der aufgeschlossenen Bakterien (vgl. 4.2.1.2) eines 5 Liter Ansatzes wird in 60 ml kaltem Waschpuffer mit Lysozym resuspendiert und anschließend pelletiert. Es folgen jeweils dreimal Resuspendieren und Pelletieren mit 50 ml Waschpuffer ohne Lysozym und anschließend fünfmal Resuspendieren und Zentrifugieren in 50 ml

Lysepuffer B1. Abschließend wird zweimal mit je 40 ml dd-H₂O resuspendiert und pelletiert. Sämtliche Überstände werden bei -80 °C gelagert. Von jeder Suspension und jedem Überstand wird ein Aliquot entnommen und per SDS-PAGE (vgl. 4.2.1.1) untersucht. Alle Zentrifugationsschritte werden bei 12000 rpm/4 °C für 20 min (Sorvall RC-5B Kühl-zentrifuge, SLA-1500-Rotor) durchgeführt.

4.2.1.4. Reduktion und Lösen der *Inclusion Bodies*

Die gereinigten *Inclusion Bodies* aus Abschnitt 4.2.1.3 eines 5 Liter-Ansatzes werden in 30 ml B1 Puffer, pH = 8.5 mit 100 mM DTT resuspendiert und 2 h bei 25 °C geschüttelt (300 rpm). Anschließend wird der Ansatz pelletiert (20min/12000rpm/4 °C) und 2-mal durch Resuspendieren mit 40 ml B1 Puffer ohne DTT gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren werden die gereinigten und reduzierten IBs in 7 ml Denaturierungslösung (6 M GdmCl, 2 mM EDTA, 1 mM TCEP, pH = 8.0) gelöst, was durch 20-minütiges Schütteln bei RT erreicht wird. Anschließend wird der pH-Wert mit 1 N HCl auf pH 3-4 eingestellt und unlösliche Bestandteile werden 20 min bei 12000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert und mit 1 N NaOH auf pH 7.0 eingestellt. Anschließend wird die Proteinkonzentration nach *Bradford* bestimmt (vgl. 4.2.1.5). Die gelösten *Inclusion Bodies* werden mit Argon entgast und in Portionen zu je 333 µl bei -80 °C gelagert.

4.2.1.5. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wird mit Hilfe des Roti-Quant Systems, das auf der Methode von *Bradford*^[100] basiert, nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Detektion des Protein-Farbstoffkomplexes erfolgt bei 595 nm. Zunächst wird eine Eichkurve mit verschiedenen BSA-Lösungen der Konzentrationen von 0.2–1 mg/ml in Denaturierungslösung erstellt. Die Messungen erfolgen mit dem UV-Spektralphotometer Ultrospec 1000, als Referenz dient 20 % ige Roti-Quant-Lösung (v/v). Für die Eichgerade werden 900 µl der 20 % igen Roti-Quant-Lösung (v/v) mit 100 µl der BSA-Eichlösung in einer 1.5 ml Polystyrolküvette versetzt und nach 7 min die Absorption bei 595 nm gemessen. Zur Konzentrationsbestimmung des denaturierten Fusionsproteins (vgl. 4.2.1.4) werden 100 µl der gelösten *Inclusion Bodies* zu 900 µl der 20 % igen Roti-Quant-Lösung (v/v) gegeben und nach 7 min die Absorption bei 595 nm bestimmt. Ist die

Absorption der Probe größer als 0.9 wird das gelöste Fusionsprotein in Denaturierungspuffer vor der Messung vorverdünnt.

4.2.1.6. Rückfaltung und Inteinspaltung

Es werden 1 ml des denaturierten Fusionsproteins aus 4.2.1.4 in einem 100 ml-Glaskolben mit Septum unter Argon vorgelegt. Zur Initiierung der Rückfaltung wird durch langsames Zutropfen der Rückfaltungslösung (500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 20 μ M PMSF, 500 mM L-Arginin, 1 mM TCEP, pH 7.4) mit Hilfe einer Spritzenpumpe mit einer Geschwindigkeit von 30 ml/h unter ständigem Rühren verdünnt. Nach Zugabe von 29 ml Rückfaltungslösung werden 100 μ l entnommen und mit 1 N HCl auf einen pH-Wert von 6.9 eingestellt. Davon werden nach 1 min 20 μ l für eine SDS-PAGE (vgl. 4.2.1.1) entnommen und eingefroren. Die restlichen 80 μ l werden nach 24 h Inkubation bei 25 °C mittels SDS-PAGE untersucht. Der Rest des Rückfaltungsansatzes wird mit weiteren 30 ml Rückfaltungslösung bei einer Tropfgeschwindigkeit von 60 ml/h bis auf eine GdmCl-Konzentration von 0.1 M verdünnt. Im Anschluss wird der pH-Wert mit 1 N HCl auf 6.9 eingestellt und nach einer Minute ein Aliquot von 20 μ l für eine spätere SDS-PAGE eingefroren. Die restliche Lösung wird für weitere 24 h bei 25 °C inkubiert und im Anschluß die Spaltungseffizienz mittels SDS-PAGE untersucht.

4.2.1.7. Modifikation des Fusionsproteins, Rückfaltung und Inteinspaltung

Modifikation mit GSSG

Es werden 1 ml des denaturierten Fusionsproteins mit 2.1 mg (7.33 mM) TCEP versetzt und bei einem pH-Wert von 7.0 frisch reduziert. Im Anschluss werden 61.4 mg (100 mM) GSSG-Disulfid zugegeben und mit 1 N NaOH der pH-Wert auf 9.3 eingestellt. Nach 24 h Inkubation bei 25 °C/1100 rpm wird der pH-Wert des modifizierten Fusionsproteins mit 1 N HCl auf 7.4 gesenkt und die Lösung in einem 100 ml-Glaskolben mit Septum unter Argon vorgelegt. Mit Hilfe einer Spritzenpumpe wird die Rückfaltungslösung ohne TCEP (500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 20 μ M PMSF, 500 mM L-Arginin, pH 7.4) mit einer Geschwindigkeit von 30 ml/h zugetropft. Nach Verdünnung bis auf 0.1 M GdmCl mit 59 ml Rückfaltungslösung wird mit 1 N HCl auf einen pH-Wert von 6.9 eingestellt. Nach 2 d Spaltung bei 25 °C wird die Spaltungseffizienz mittels SDS-PAGE (vgl. 4.2.1.1) untersucht.

Modifikation mit 3,3'-Dithiodipropionsäure

Zu 1 ml des denaturierten Fusionsproteins werden 2.1 mg (7.33 mM) TCEP gegeben und bei einem pH-Wert von 7.0 frisch reduziert. Im Anschluss werden 20.1 mg (100 mM) 3,3'-Dithiodipropionsäure zugegeben und mit 1 N NaOH der pH-Wert auf 8.5 eingestellt. Nach 24 h Inkubation bei 25 °C/1100 rpm wird die Lösung in vier 250 µl-Portionen aufgeteilt. Der pH-Wert der vier Ansätze wird auf 4.5, 6.5, 7.5 und 8.5 eingestellt und die Aliquots werden jeweils in einem 50 ml-Glaskolben mit Septum unter Argon vorgelegt. Mit Hilfe einer Spritzenpumpe werden zu jedem Ansatz 14 ml Rückfaltungslösung ohne TCEP (500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 20 µM PMSF, 500 mM L-Arginin) mit einer Geschwindigkeit von 30 ml/h zugetropft, was zu einer Endkonzentration von 0.1 M GdmCl führt. Der pH-Wert des Rückfaltungspuffers entspricht dabei jeweils dem nach der Reduktion eingestellten pH-Wert. Im Anschluss wird der pH-Wert aller Ansätze mit 1 N HCl bzw. 1 N NaOH auf 6.9 eingestellt, alle Ansätze zur Spaltung 2 d bei 25 °C inkubiert und die Spaltungseffizienz der vier Ansätze mittels SDS-PAGE (vgl. 4.2.1.1) kontrolliert. Für einen präparativen Ansatz werden nach Auswertung der SDS-PAGE Ergebnisse 1 ml Fusionsprotein wie beschrieben modifiziert und bei einem pH-Wert von 7.4 rückgefaltet.

Modifikation mit Methanthiosulfonsäure-S-methylester

Es werden 1 ml des denaturierten Fusionsproteins mit 2.1 mg (7.33 mM) TCEP versetzt und bei einem pH-Wert von 7.0 frisch reduziert. Im Anschluß werden 1.7 µl (2.1 mg, 50 mM) Methanthiosulfonsäure-S-methylester zugegeben und mit 1 N NaOH der pH-Wert auf 8.5 eingestellt. Nach 24 h Inkubation bei 25 °C/1100 rpm bzw. 1 h auf Eis wird der pH-Wert des modifizierten Fusionsproteins mit 1 N HCL auf 7.4 gesenkt und die Lösung in einem 100 ml-Glaskolben mit Septum unter Argon vorgelegt. Mit Hilfe einer Spritzenpumpe wird die Rückfaltungslösung ohne TCEP (500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 20 µM PMSF, 500 mM L-Arginin, pH 7.4) mit einer Geschwindigkeit von 30 ml/h zugetropft. Nach Verdünnung bis auf 0.1 M GdmCl mit 59 ml Rückfaltungslösung wird mit 1 N HCl auf einen pH-Wert von 6.9 eingestellt. Nach 2 d Spaltung bei 25 °C wird die Spaltungseffizienz mittels SDS-PAGE (vgl. 4.2.1.1) untersucht.

Modifikation mit 2-Carboxyethyl-methanthiosulfonat

Zu 1 ml des denaturierten Fusionsproteins werden 2.1 mg (7.33 mM) TCEP gegeben und bei einem pH-Wert von 7.0 frisch reduziert. Anschließend werden 9.21 mg (50 mM) 2-Carboxyethyl-methanthiosulfonat zugegeben und mit 1 N NaOH der pH-Wert auf 8.5 eingestellt. Nach 24 h Inkubation bei 25 °C/1100 rpm wird die Lösung in einem 100 ml-Glaskolben mit Septum unter Argon vorgelegt. Mit Hilfe einer Spritzenpumpe werden 59 ml Rückfaltungslösung ohne TCEP (500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 Tabletten Complete, 500 mM L-Arginin) mit einer Geschwindigkeit von 30 ml/h bis zu einer Endkonzentration von 0.1 M GdmCl zugetropft. Im Anschluss wird der pH-Wert mit 1 N HCl auf 6.9 eingestellt und nach jeweils 1 d, 2 d, 3 d und 4 d ein Aliquot für die SDS-PAGE (vgl. 4.2.1.1) entnommen und die Spaltung gelelektrophoretisch untersucht.

4.2.1.8. Isolierung und Reinigung von *RNase* 40-124

Für die Isolierung der cysteingeschützten Fragmente der *RNase* 40-124 werden die verdünnten Rückfaltungslösungen konzentriert. Zunächst werden die Lösungen bei 25°C/4000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert, um aggregiertes Protein zu pelletieren. Anschließend werden die Überstände der Rückfaltung von einem Milliliter gelöster *Inclusion Bodies* (60 ml) zunächst unter Argonatmosphäre in 6 x 10 ml Centriplus YM-3 Zentrifugationseinheiten pipettiert. Bei 4 °C/6000 rpm (Sorvall RC-5B Kühlzentrifuge, SS34-Rotor) werden die Lösungen bis auf ein Volumen von unter 500 µl konzentriert. Die verbleibenden Lösungen werden im Anschluss in 500 µl Microcon YM-3 Zentrifugationseinheiten überführt und bei 4 °C/11600 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge 5417R) bis auf ein Volumen von etwa 100 µl eingeeengt. Die geschützten Fragmente der *RNase* 40-124 werden im Anschluss mittels RP-HPLC auf einer XDB-C8 5 µm (150x2.1 mm) Säule mit einem linearen Gradienten von 10 auf 50 % Acetonitril/Wasser/ 0.1 % Ameisensäure bei einem Fluss von 1 ml/min in 4 Säulenvolumen gereinigt. Die gesammelten Fraktionen mit den jeweiligen Zielpeptiden **1**, **2** und **3** werden vereinigt, im Hochvakuum bis zur Trockne eingedampft und die Reinheit durch LC-MS überprüft.

LC-MS-Analyse:

Es werden jeweils 0.05 mg der isolierten *RNase* 40-124 **1**, **2** bzw. **3** in 10 % Acetonitril/Wasser gelöst und massenspektrometrisch untersucht.

Säule: YMC-Pack ODS-A S-3 μm (100x2.1 mm), Lösungsmittel A: Wasser mit 0.1 % Ameisensäure, Lösungsmittel B: Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure; Gradient: linear, Start 10 % B, in 20 min auf 50 %, Flussrate 200 $\mu\text{l/min}$, UV-Detektion von 215 bis 275 nm;

RNase 40-124 1, durch Modifikation mit GSSG

Ausbeute: 2.1 mg pro Liter LB-Medium

- 1 SG: $\text{C}_{407}\text{H}_{627}\text{N}_{115}\text{O}_{136}\text{S}_9$ (9595.61)
 $M_{\text{ber}} = 9589.32$; $M_{\text{gef}} = 1371.73$ (M+7H)⁷⁺, 1200.43 (M+8H)⁸⁺
- 3 SG: $\text{C}_{427}\text{H}_{659}\text{N}_{121}\text{O}_{148}\text{S}_{11}$ (10208.24)
 $M_{\text{ber}} = 10201.47$; $M_{\text{gef}} = 1459.33$ (M+7H)⁷⁺, 1276.86 (M+8H)⁸⁺
- 5 SG: $\text{C}_{447}\text{H}_{691}\text{N}_{127}\text{O}_{160}\text{S}_{13}$ (10820.87)
 $M_{\text{ber}} = 10813.62$; $M_{\text{gef}} = 1546.66$ (M+7H)⁷⁺, 1353.29 (M+8H)⁸⁺

RNase 40-124 2, durch Modifikation mit 3,3'-Dithiodipropionsäure

Ausbeute: 2.8 mg pro Liter LB-Medium

- 1 SG: $\text{C}_{400}\text{H}_{616}\text{N}_{112}\text{O}_{132}\text{S}_9$ (9394.43)
 $M_{\text{ber}} = 9388.24$; $M_{\text{gef}} = 1566.70$ (M+6H)⁶⁺, 1343.00 (M+7H)⁷⁺
- 3 SG: $\text{C}_{406}\text{H}_{626}\text{N}_{112}\text{O}_{136}\text{S}_{11}$ (9604.70)
 $M_{\text{ber}} = 9598.24$; $M_{\text{gef}} = 1601.56$ (M+6H)⁶⁺, 1373.04 (M+7H)⁷⁺
- 5 SG: $\text{C}_{412}\text{H}_{636}\text{N}_{112}\text{O}_{140}\text{S}_{13}$ (9814.97)
 $M_{\text{ber}} = 9808.25$; $M_{\text{gef}} = 1636.53$ (M+6H)⁶⁺, 1403.03 (M+7H)⁷⁺
- 7 SG: $\text{C}_{418}\text{H}_{646}\text{N}_{112}\text{O}_{144}\text{S}_{15}$ (10025.24)
 $M_{\text{ber}} = 10018.25$; $M_{\text{gef}} = 1671.59$ (M+6H)⁶⁺, 1433.09 (M+7H)⁷⁺

RNase 40-124 3, durch Modifikation mit 2-Carboxyethyl-methanthiosulfonat

Ausbeute: 3.5 mg pro Liter LB-Medium

$\text{C}_{418}\text{H}_{646}\text{N}_{112}\text{O}_{144}\text{S}_{15}$ (10025.24), vollständig geschützt

$M_{\text{ber}} = 10018.25$

$M_{\text{gef}} = 1433.06$ (M+7H)⁷⁺, 1254.00 (M+8H)⁸⁺

4.2.1.9. Synthese von Glycoproteinen durch native chemische Ligation

Synthese von Met-RNase 1-124 5

In einem 1.5 ml Eppendorfgefäß werden 0.4 mg (0.086 µmol) Thioester Met-RNase 1-39 **4** und 0.3 mg (0.030 µmol) des mit Glutathion modifizierten Fragments RNase 40-124 **1** in 90 µl entgastem Ligationspuffer (6 M GdmCl, 0.1 M Na₂HPO₄, pH = 7.5) gelöst. Die Reaktion wird durch Zugabe von 3 % Thiophenol (2.7 µl, v/v) gestartet und mit Argon überschichtet. Nach zwei Tagen Inkubation im Thermomixer bei 1100 rpm/25 °C wird der Erfolg der Reaktion durch LC-MS kontrolliert. Für die SDS-PAGE wird 1 µl entnommen, mit 25 µl dd-H₂O versetzt und auf das Gel aufgetragen (vgl. 4.2.1.1).

LC-MS-Analyse der Ligation zu Met-RNase 1-124

Es werden 2 µl der Ligationlösung entnommen, in 25 µl 10 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure gelöst und direkt massenspektrometrisch untersucht. Weitere 5 µl werden zu 0.2 mg (12.8 µmol) DTT gegeben und bei 1100 rpm/25 °C geschüttelt bis die vorher trübe Lösung klar ist. Von dieser Mischung werden 2 µl entnommen, in 25 µl 10 % Acetonitril/Wasser gelöst und durch LC-MS untersucht.

Säule: YMC-Pack ODS-A S-3 µm (100x2.1 mm), Lösungsmittel A: Wasser mit 0.1 % Ameisensäure, Lösungsmittel B: Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure; Gradient: linear, Start 10 % B, in 20 min auf 50 %, Flussrate 200 µl/min, UV-Detektion von 215 bis 275 nm;

C₅₈₀H₉₁₉N₁₇₂O₁₉₄S₁₃ (13822.38)

M_{ber} = 13813.37

M_{gef} = 1254.35 (M+11H)¹¹⁺, 1153.11 (M+12H)¹²⁺

Synthese von RNase 1-124, Asn34(Ac₃GlcNAc) 7

In einem 1.5 ml Eppendorfgefäß werden 0.3 mg (0.063 µmol) Glycopeptidthioester RNase 1-39, Asn34(Ac₃GlcNAc) **6** und 0.5 mg (0.049 µmol) des mit Glutathion modifizierten Fragments RNase 40-124 **1** in 30 µl entgastem Ligationspuffer (6 M GdmCl, 0.1 M Na₂HPO₄, pH = 7.5) gelöst. Nach Zugabe von 3 % Thiophenol (0.9 µl, v/v) wird die

Reaktion mit Argon überschichtet und nach zwei Tagen Inkubation bei 1100 rpm/25 °C durch LC-MS analysiert. Für die SDS-PAGE werden 2 µl entnommen, mit 30 µl dd-H₂O versetzt und auf das Gel aufgetragen (vgl. 4.2.1.1).

LC-MS-Analyse der Ligation zu RNase 1-124, Asn34(Ac₃GlcNAc)

Von der Ligationlösung werden 5 µl entnommen, zu 0.2 mg (12.8 µmol) DTT gegeben und bei 1100 rpm/25 °C für 15 min geschüttelt. Von dieser Mischung werden 2 µl in 25 µl 10 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure gelöst und durch LC-MS untersucht.

Säule: YMC-Pack ODS-A S-3 µm (100x2.1 mm), Lösungsmittel A: Wasser mit 0.1 % Ameisensäure, Lösungsmittel B: Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure; Gradient: linear, Start 10 % B, in 20 min auf 50 %, Flussrate 200 µl/min, UV-Detektion von 215 bis 275 nm;

C₅₈₉H₉₂₈N₁₇₂O₂₀₁S₁₂ (14019.48)

M_{ber} = 14010.43

*Synthese von RNase 30-124, Asn34HeptaAc **9** und Acetatabspaltung zu RNase 30-124, Asn34Hepta **10***

In einem 1.5 ml Eppendorfgefäß werden 0.21 mg (0.061 µmol) Glycopeptidthioester *RNase* 30-39 **8** und 0.4 mg (0.042 µmol) des mit DTDP modifizierten Fragments *RNase* 40-124 **2** in 25 µl entgastem Ligationspuffer (6 M GdmCl, 0.1 M Na₂HPO₄, pH = 7.5) gelöst. Nach Zugabe von 3 % Thiophenol (0.75 µl, v/v) wird mit Argon überschichtet und zwei Tage im Thermomixer bei 1100 rpm/25 °C geschüttelt. Der Erfolg der Reaktion wird durch einen LC-MS-Lauf kontrolliert. Nach 2 Tagen werden die Acetatgruppen durch Zugabe von 20 µl 10 % igem wässrigem Hydrazinhydrat mit 0.2 M DTT direkt in der rohen Ligationmischung abgespalten. Nach 1 h wird der Erfolg der Abspaltung mittels LC-MS analysiert.

LC-MS-Analyse von RNase 30-124, Asn34HeptaAc und RNase 30-124, Asn34Hepta

Es werden jeweils 4 µl der Ligationlösung bzw. der Abspaltungsreaktion zu 0.2 mg (12.8 µmol) DTT gegeben und bei 1100 rpm/25 °C für 15 min geschüttelt. Davon werden je 2 µl entnommen, in jeweils 25 µl 10 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure gelöst und mittels LC-MS analysiert.

Säule: YMC-Pack ODS-A S-3 µm (100x2.1 mm), Lösungsmittel A: Wasser mit 0.1 % Ameisensäure, Lösungsmittel B: Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure; Gradient: linear, Start 10 % B, in 20 min auf 50 %, Flussrate 200 µl/min, UV-Detektion von 215 bis 275 nm;

RNase 30-124, Asn34HeptaAc **9**

$C_{533}H_{827}N_{135}O_{198}S_9$ (12582.64)

$M_{ber} = 12574.63$

$M_{gef} = 1573.42 (M+8H)^{8+}, 1398.52 (M+9H)^{9+}$

RNase 30-124, Asn34Hepta **10**

$C_{497}H_{791}N_{135}O_{180}S_9$ (11825.98)

$M_{ber} = 11818.44$

$M_{gef} = 1316.18 (M+9H)^{9+}, 1183.71 (M+10H)^{10+}$

Synthese von RNase AcThz-26-124, Asn34NonaAc **12** *und Acetatabspaltung zu RNase AcThz-26-124, Asn34Nona* **13**

Es werden 0.2 mg (0.044 µmol) acetylierter Glycopeptidthioester *RNase* AcThz-26-39 **11** und 0.3 mg (0.031 µmol) des mit DTDP modifizierten Fragments *RNase* 40-124 **2** in 25 µl entgastem Ligationspuffer (6 M GdmCl, 0.1 M Na₂HPO₄, pH = 7.5) in einem 1.5 ml Eppendorfgefäß gelöst. Nach Zugabe von 3 % Thiophenol (0.75 µl, v/v) wird die Reaktion mit Argon überschichtet und zwei Tage im Thermomixer bei 1100 rpm/ 25 °C geschüttelt. Der Erfolg der Ligation wird durch LC-MS analysiert. Nach erfolgreicher Reaktion werden die Acetatgruppen durch Zugabe von 20 µl 10 % igem wässrigem Hydrazinhydrat mit 0.2 M DTT direkt in der rohen Ligationmischung abgespalten. Nach 1.5 h wird der Erfolg der Abspaltung mittels LC-MS analysiert.

LC-MS-Analyse von RNase AcThz-26-124, Asn34NonaAc und RNase AcThz-26-124, Asn34Nona

Von der Ligationlösung vor bzw. nach der Zugabe von Hydrazinhydrat werden je 4 µl zu 0.2 mg (12.8 µmol) DTT gegeben und bei 1100 rpm/25 °C für 15 min inkubiert. Die Lösung nach der Acetatabspaltung bleibt dabei trüb. Von beiden Mischungen werden je 2 µl entnommen, in jeweils 25 µl 10 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure gelöst und mittels LC-MS analysiert.

Säule: YMC-Pack ODS-A S-3 µm (100x2.1 mm), Lösungsmittel A: Wasser mit 0.1 % Ameisensäure, Lösungsmittel B: Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure; Gradient: linear, Start 10 % B, in 20 min auf 50 %, Flussrate 200 µl/min, UV-Detektion von 215 bis 275 nm;

RNase AcThz-26-124, Asn34NonaAc **12**

$C_{577}H_{889}N_{141}O_{221}S_{11}$ (13689.76)

$M_{ber} = 13680.96$

$M_{gef} = 1955.25 (M+7H)^{7+}, 1711.32 (M+8H)^{8+},$

RNase AcThz-26-124, Asn34Nona **13**

$C_{529}H_{841}N_{141}O_{197}S_{11}$ (12680.88)

$M_{ber} = 12672.71$

Optimierte Synthese von Met-RNase 1-124 **5** *und Met-RNase 1-124, (SCE)₈* **14**

In einem mit Schraubdeckel verschließbaren 1 ml Glasgefäß werden 0.28 mg (0.06 µmol) Thioester Met-RNase 1-39 **4** und 0.50 mg (0.050 µmol) vollständig SCE-geschütztes Fragment RNase 40-124 **3** in 42 µl optimiertem Ligationspuffer 2 (6 M GdmCl, 0.1 M Na₂HPO₄, 2 mM EDTA, 30 mM TCEP, pH = 7.5) gelöst und die Reaktion durch Zugabe von 3 % Thiophenol (1.26 µl, v/v) gestartet. Das Reaktionsgefäß wird unter Argonatmosphäre mit einem Schraubdeckel verschlossen, zwei Tage bei 25 °C in einem anaeroben Zelt inkubiert und mittels LC-MS analysiert. Für die SDS-PAGE wird 1 µl entnommen, mit 25 µl dd-H₂O versetzt und auf das Gel aufgetragen (vgl. 4.2.1.1). Nach erfolgter Ligation werden aus der Lösung 20 µl entnommen und mit 20 µl Ligationspuffer 2

(vgl. 4.1.4) ohne Thiophenol versetzt und 40 min bei 25 °C inkubiert. Im Anschluss werden 2.2 mg (0.3 M) 2-Carboxyethyl-methanthiosulfonat zugegeben und der pH-Wert mit 10 N NaOH auf pH = 8.5 eingestellt. Nach Reaktion über Nacht bei 25 °C im anaeroben Zelt wird mittels LC-MS analysiert. Beide 20 µl Portionen (vor und nach der Reaktion mit CEMTS) werden mit jeweils 230 µl 10 % Acetonitril/Wasser/0.1 % versetzt. Die Reinigung erfolgt im Anschluss durch Gelfiltration (Superdex Peptide PE (300x7.5) mit 10 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure als Laufmittel, Fluss von 0.2 ml/min). Die gesammelten Fraktionen mit den jeweiligen Peptiden werden vereinigt und im Hochvakuum bis zur Trockne eingedampft. Es können 0.12 mg Met-RNase 1-124 **5** und 0.11 mg cysteingeschützte Met-RNase 1-124 **14** erhalten werden.

LC-MS-Analyse von Met-RNase 1-124 und Met-RNase 1-124, (SCE)₈

Es werden vor und nach der Reaktion mit CEMTS jeweils 1 µl der Ligationslösung entnommen, in je 25 µl 10 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure gelöst und massenspektrometrisch untersucht.

Säule: YMC-Pack ODS-A S-3 µm (100x2.1 mm), Lösungsmittel A: Wasser mit 0.1 % Ameisensäure, Lösungsmittel B: Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure; Gradient: linear, Start 10 % B, in 20 min auf 50 %, Flussrate 200 µl/min, UV-Detektion von 215 bis 275 nm;

*Met-RNase 1-124 **5***

Ausbeute: 0.12 mg (36 %)

$C_{580}H_{919}N_{172}O_{194}S_{13}$ (13822.38)

$M_{ber} = 13813.37$

$M_{gef} = 1536.69 (M+9H)^{9+}, 1383.10 (M+10H)^{10+}$

*Met-RNase 1-124, (SCE)₈ **14***

Ausbeute: 0.11 mg (33 %)

$C_{604}H_{951}N_{172}O_{210}S_{21}$ (14655.41)

$M_{ber} = 14645.32$

$M_{gef} = 1629.23 (M+9H)^{9+}, 1466.45 (M+10H)^{10+}$

*Synthese von RNase Thz-26-124, Asn34Nona **16** und Thiazolidinöffnung zu RNase 26-124, Asn34Nona **17***

In einem 1 ml Glasgefäß werden 0.5 mg (0.14 µmol) Glycopeptidthioester *RNase* Thz-26-39 **15** und 2.0 mg (0.20 µmol) vollständig SCE-geschütztes Fragment *RNase* 40-124 **3** in 125 µl optimiertem Ligationspuffer 2 (6 M GdmCl, 0.1 M Na₂HPO₄, 2 mM EDTA, 30 mM TCEP, pH = 7.5) gelöst. Die Reaktion wird durch Zugabe von 3 % Thiophenol (3.75 µl, v/v) gestartet und das Reaktionsgefäß unter Argonatmosphäre mit einem Schraubdeckel verschlossen. Die Ligationslösung wird zwei Tage bei 25 °C in einem anaeroben Zelt inkubiert und mittels LC-MS analysiert. Für die SDS-PAGE (vgl. 4.2.1.1) wird 1 µl entnommen, mit 25 µl dd-H₂O versetzt und der Erfolg der Reaktion zusätzlich zur LC-MS durch Gelelektrophorese kontrolliert. Die Freisetzung des N-terminalen Cysteins erfolgt durch Mischen der Ligationslösung mit dem gleichen Volumen an Abspaltungslösung (6 M GdmCl, 0.1 M Na₂HPO₄, 2 mM EDTA, 30 mM TCEP, 0.2 M Methoxyamin, pH = 2.0). Im Anschluss wird der pH-Wert mit 1 N HCl auf 3-4 eingestellt. Nach 4 h und 21 h wird das Fortschreiten der Thiazolidinöffnung durch LC-MS-Analyse kontrolliert.

LC-MS-Analyse von RNase Thz-26-124, Asn34Nona und RNase 26-124, Asn34Nona

Es werden von der Ligationslösung nach 2 d und nach 4 bzw. 21 h der Reaktion mit Methoxyamin jeweils 1 µl entnommen, in je 25 µl 10 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure gelöst und mittels LC-MS untersucht.

Säule: YMC-Pack ODS-A S-3 µm (100x2.1 mm), Lösungsmittel A: Wasser mit 0.1 % Ameisensäure, Lösungsmittel B: Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure; Gradient: linear, a) Start 10 % B, in 20 min auf 50 %; b) Start 20 % B, in 20 min auf 40 %; Flussrate 200 µl/min, UV-Detektion von 215 bis 275 nm;

*RNase Thz-26-124, Asn34Nona **16***

C₅₂₇H₈₃₉N₁₄₁O₁₉₆S₁₁ (12638.84)

M_{ber} = 12630.69

M_{gef} = 1580.85 (M+8H)⁸⁺, 1405.37 (M+9H)⁹⁺

RNase 26-124, Asn34Nona **17**

$C_{526}H_{839}N_{141}O_{196}S_{11}$ (12626.83)

$M_{\text{ber}} = 12618.69$

$M_{\text{gef}} = 1579.45 (M+8H)^{8+}, 1404.04 (M+9H)^{9+}$

Synthese von RNase 1-124, Asn34Nona **19**

Zu 125 µl Ligationmischung der Synthese von **17** werden ohne Zwischenreinigung 0.2 mg (0.071 µmol) des Thioesters *RNase* 1-25 **18** in 25 µl Ligationspuffer mit 100 mM TCEP, pH = 7.0 gegeben und der pH-Wert der Reaktion mit 1 N NaOH auf einen Wert von 6.6 eingestellt. Nach jeweils 24 h Inkubationszeit wird der pH-Wert um jeweils 0.3 Einheiten bis zu einem Wert von pH = 7.5 erhöht. Vor jeder pH-Erhöhung wird die Ligation durch LC-MS untersucht. Zusätzlich wird bei pH = 7.0 ein Aliquot von 1 µl entnommen, mit 25 µl dd-H₂O versetzt und mittels SDS-PAGE (vgl. 4.2.1.1) analysiert.

LC-MS-Analyse der Ligation zu RNase 1-124, Asn34Nona

Es werden bei jeder pH-Stufe 2 µl der Ligationlösung entnommen, in 25 µl 10 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure gelöst und massenspektrometrisch untersucht.

Säule: YMC-Pack ODS-A S-3 µm (100x2.1 mm), Lösungsmittel A: Wasser mit 0.1 % Ameisensäure, Lösungsmittel B: Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure; Gradient: linear, Start 10 % B, in 20 min auf 50 %, Flussrate 200 µl/min, UV-Detektion von 215 bis 275 nm;

$C_{637}H_{1011}N_{175}O_{238}S_{12}$ (15313.56)

$M_{\text{ber}} = 15303.81$

$M_{\text{gef}} = 1531.74 (M+10H)^{10+}, 1392.49 (M+11H)^{11+}$

Synthese von RNase Mapoc-26-124, Asn34Nona **21** und UV-Entschützung zu *RNase* 26-124, Asn34Nona **17**

In einem 1ml Glasgefäß werden 0.13 mg (0.036 µmol) Glycopeptidthioester *RNase* Mapoc-26-39 **20** und 0.35 mg (0.035 µmol) vollständig SCE-geschütztes Fragment

RNase 40-124 **3** in 25 µl optimiertem Ligationspuffer 2 (6 M GdmCl, 0.1 M Na₂HPO₄, 2 mM EDTA, 30 mM TCEP, pH = 7.5) gelöst. Die Reaktion wird durch Zugabe von 3 % Thiophenol (0.75 µl, v/v) gestartet, das Reaktionsgefäß unter Argonatmosphäre mit einem Schraubdeckel verschlossen und mit Alufolie vor Lichteinwirkung geschützt. Zur Untersuchung der Kinetik der Umesterung von **20** und der Reduktion des Fragments *RNase* 40-124 **3** wird bereits nach 1 h eine LC-MS durchgeführt. Die Ligationslösung wird im Anschluss zwei Tage bei 25 °C in einem anaeroben Zelt inkubiert und mittels LC-MS analysiert. Für die SDS-PAGE (vgl. 4.2.1.1) wird 1 µl entnommen, mit 25 µl dd-H₂O versetzt und der Erfolg der Reaktion mit LC-MS und Gelelektrophorese kontrolliert. Zur Abspaltung der Mapoc-Schutzgruppe und Freisetzung des N-terminalen Cysteins wird das Reaktionsgefäß unter Eiswasserkühlung 20 min mit einer 125 Watt Hg-Lampe (> 300 nm) bestrahlt. Die UV-Abspaltung wird im Anschluss durch LC-MS analysiert.

LC-MS-Analyse von RNase Mapoc-26-124, Asn34Nona und RNase 26-124, Asn34Nona

Es werden je 1 µl der Ligationslösung direkt und nach 20 Minuten UV-Bestrahlung entnommen, in je 25 µl 10 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure gelöst und durch LC-MS analysiert.

Säule: YMC-Pack ODS-A S-3 µm (100x2.1 mm), Lösungsmittel A: Wasser mit 0.1 % Ameisensäure, Lösungsmittel B: Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure; Gradient: linear, Start 10 % B, in 20 min auf 50 %, Flussrate 200 µl/min, UV-Detektion von 215 bis 275 nm;

RNase Mapoc-26-124, Asn34Nona **21**

C₅₃₇H₈₅₀N₁₄₂O₁₉₉S₁₁ (12832.04)

M_{ber} = 12823.77

M_{gef} = 1833.65 (M+7H)⁷⁺, 1604.86 (M+8H)⁸⁺

RNase 26-124, Asn34Nona **17**

C₅₂₆H₈₃₉N₁₄₁O₁₉₆S₁₁ (12626.83)

M_{ber} = 12618.69

M_{gef} = 1804.55 (M+7H)⁷⁺, 1579.19 (M+8H)⁸⁺

Synthese von RNase Mapoc-26-124, Asn34Nona, (SCE)₈ **22**

Zur Schützung der SH-Gruppen von *RNase Mapoc-26-124* wird ein 25 µl Ligationsansatz zur Synthese von **21** nach 2 Tagen mit 25 µl Ligationspuffer 2 ohne Thiophenol versetzt, mit Alufolie vor Lichteinwirkung geschützt und 40 min bei 25 °C inkubiert. Im Anschluß werden 2.75 mg (0.3 M) 2-Carboxyethyl-methanthiosulfonat zugegeben und der pH-Wert mit 10 N NaOH auf pH = 8.5 eingestellt. Nach Reaktion über Nacht bei 25 °C im anaeroben Zelt wird die Reaktion mittels LC-MS analysiert. Die Freisetzung des N-terminalen Cysteins erfolgt durch UV-Bestrahlung unter Eiswasserkühlung für 20 min mit einer 120 Watt Hg-Lampe (> 300 nm). Die Effizienz der Abspaltung wird durch LC-MS überprüft.

LC-MS-Analyse von RNase Mapoc-26-124, Asn34Nona, (SCE)₈ und RNase 26-124, Asn34Nona, (SCE)₈

Es werden je 1 µl der Ligationslösung nach Reaktion mit CEMTS und im Anschluß nach 20 Minuten UV-Bestrahlung entnommen, in je 25 µl 10 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure gelöst und durch LC-MS analysiert.

Säule: YMC-Pack ODS-A S-3 µm (100x2.1 mm), Lösungsmittel A: Wasser mit 0.1 % Ameisensäure, Lösungsmittel B: Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure; Gradient: linear, Start 10 % B, in 20 min auf 50 %, Flussrate 200 µl/min, UV-Detektion von 215 bis 275 nm;

RNase Mapoc-26-124, Asn34Nona, (SCE)₈

C₅₆₁H₈₈₂N₁₄₂O₂₁₅S₁₉ (13665.06)

M_{ber} = 13655.71

M_{gef} = 1709.62 (M+8H)⁸⁺, 1519.76 (M+9H)⁹⁺

*Synthese von RNase Thz-26-124, [Asn34Pra] **24** und Thiazolidinöffnung zu RNase 26-124, [Asn34Pra] **25***

In einem 1 ml Glasgefäß werden 0.06 mg (0.033 µmol) Thioester *RNase Thz-26-39*, [Asn34Pra] **23** und 0.35 mg (0.035 µmol) vollständig SCE-geschütztes Fragment

RNase 40-124 **3** in 25 µl Ligationspuffer 2 (6 M GdmCl, 0.1 M Na₂HPO₄, 2 mM EDTA, 30 mM TCEP, pH = 7.5) gelöst. Nach Zugabe von 3 % Thiophenol (0.75 µl, v/v) wird das Reaktionsgefäß unter Argonatmosphäre mit einem Schraubdeckel verschlossen und die Lösung zwei Tage bei 25 °C in einem anaeroben Zelt inkubiert. Das Ligationprodukt wird mittels LC-MS detektiert. Für die SDS-PAGE (vgl. 4.2.1.1) wird 1 µl entnommen, mit 25 µl dd-H₂O versetzt und durch Gelelektrophorese analysiert. Die Freisetzung des N-terminalen Cysteins erfolgt durch Mischen der Ligationlösung mit dem gleichen Volumen an Abspaltungslösung (6 M GdmCl, 0.1 M Na₂HPO₄, 2 mM EDTA, 30 mM TCEP, 0.2 M Methoxyamin pH = 2) und anschließender Einstellung des pH-Wertes auf 3-4 mit 1 N HCl. Nach 20 h wird die Thiazolidinöffnung durch LC-MS-Analyse kontrolliert. Die Reaktionslösung (ca. 50 µl) wird im Anschluß mit 200 µl 10 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure versetzt und durch Gelfiltration (Superdex Peptide PE, (300x7.5) mit 10 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure als Laufmittel, Fluss von 0.2 ml/min) gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielpeptid werden gesammelt und im Hochvakuum bis zur Trockne eingedampft. Es wird eine Ausbeute von 0.16 mg *RNase* 26-124, [Asn34Pra] **25** erhalten.

LC-MS-Analyse von RNase Thz-26-124, [Asn34Pra] und RNase 26-124, [Asn34Pra]

Es werden vor und nach der Behandlung mit Methoxyamin je 1 µl der Ligationlösung entnommen, in je 25 µl 10 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure gelöst und durch LC-MS analysiert.

Säule: YMC-Pack ODS-A S-3 µm (100x2.1 mm), Lösungsmittel A: Wasser mit 0.1 % Ameisensäure, Lösungsmittel B: Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure; Gradient: linear, Start 10 % B, in 20 min auf 50 %, Flussrate 200 µl/min, UV-Detektion von 215 bis 275 nm;

RNase Thz-26-124, [Asn34Pra] 24

C₄₆₆H₇₃₆N₁₃₆O₁₅₀S₁₁ (10996.37)

M_{ber} = 10989.11

M_{gef} = 1572.78 (M+7H)⁷⁺, 1376.22 (M+8H)⁸⁺

RNase 26-124, [Asn34Pra] 25

Ausbeute: 0.16 mg (44 %)

$C_{465}H_{736}N_{136}O_{150}S_{11}$ (10984.36)

$M_{\text{ber}} = 10977.11$

$M_{\text{gef}} = 1571.44 (M+7H)^{7+}, 1375.16 (M+8H)^{8+}$

Synthese von RNase 1-124, [Asn34Pra] 26

In einem 1 ml Glasgefäß werden 0.15 mg (0.053 μmol) Thioester *RNase* 1-25 **18** und 0.16 mg (0.016 μmol) isoliertes Peptid *RNase* 26-124, [Asn34Pra] **25** in 25 μl Ligationspuffer 3 (6 M GdmCl, 0.1 M Na_2HPO_4 , 2 mM EDTA, 30 mM TCEP, 0.2 M MPAA, pH = 7.0) gelöst. Das Reaktionsgefäß wird unter Argonatmosphäre mit einem Schraubdeckel verschlossen und die Lösung nach einem Tag Inkubation bei 25 °C in einem anaeroben Zelt mittels LC-MS analysiert. Für die SDS-PAGE (vgl. 4.2.1.1) werden 2 μl entnommen, mit 25 μl dd- H_2O versetzt durch Gelelektrophorese analysiert. Die Reaktionslösung wird im Anschluss mit 200 μl 10 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure versetzt und durch Gelfiltration (Superdex Peptide PE (300x7.5) mit 10 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure als Laufmittel, Fluss von 0.2 ml/min) gereinigt. Die gesammelten Fraktionen mit dem Zilopeptid werden vereinigt und im Hochvakuum bis zur Trockne eingedampft. Im Anschluss wird das synthetische Enzym rückgefaltet und ein Aktivitätstest durchgeführt (vgl. 4.2.1.10).

LC-MS-Analyse der Ligation zu RNase 1-124, [Asn34Pra]

Von der Ligationlösung werden 2 μl entnommen, in 25 μl 10 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure gelöst und durch LC-MS untersucht.

Säule: YMC-Pack ODS-A S-3 μm (100x2.1 mm), Lösungsmittel A: Wasser mit 0.1 % Ameisensäure, Lösungsmittel B: Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure; Gradient: linear, Start 10 % B, in 20 min auf 50 %, Flussrate 200 $\mu\text{l}/\text{min}$, UV-Detektion von 215 bis 275 nm;

$C_{576}H_{908}N_{170}O_{192}S_{12}$ (13671.18)

$M_{\text{ber}} = 13662.32$

$M_{\text{gef}} = 1519.76 (M+9H)^{9+}, 1367.86 (M+10H)^{10+}$

Synthese von RNase Thz-26-124, Asn34GlcNAc, [Met30Nle, Met31Nle] 28 und Thiazolidinöffnung zu RNase 26-124, Asn34GlcNAc, [Met30Nle, Met31Nle] 29

In einem 1 ml Glasgefäß werden 0.08 mg (0.040 µmol) Glycopeptidthioester *RNase* Thz-26-39, Asn34GlcNAc, [Met30Nle, Met31Nle] **27** und 0.40 mg (0.040 µmol) vollständig SCE-geschütztes Fragment *RNase* 40-124 **3** in 25 µl optimiertem Ligationspuffer 2 (6 M GdmCl, 0.1 M Na₂HPO₄, 2 mM EDTA, 30 mM TCEP, pH = 7.5) gelöst. Die Reaktion wird durch Zugabe von 3 % Thiophenol (0.75 µl, v/v) gestartet und das Reaktionsgefäß unter Argonatmosphäre mit einem Schraubdeckel verschlossen. Die Lösung wird zwei Tage bei 25 °C in einem anaeroben Zelt inkubiert und mittels LC-MS analysiert. Für die Gelelektrophorese (vgl. 4.2.1.1) wird 1 µl entnommen und mit 25 µl dd-H₂O versetzt. Die Freisetzung des N-terminalen Cysteins erfolgt durch Mischen der Ligationslösung mit dem gleichen Volumen an Abspaltungslösung (6 M GdmCl, 0.1 M Na₂HPO₄, 2 mM EDTA, 30 mM TCEP, 0.2 M Methoxyamin, pH = 2.0) und anschließender Einstellung des pH-Wertes mit 1 N HCl auf 3-4. Nach 21 h wird die Öffnung des Thiazolidins durch LC-MS-Analyse kontrolliert. Die Reaktionslösung (50 µl) wird mit 10 µl Ligationspuffer (6 M GdmCl, 0.1 M Na₂HPO₄, 2 mM EDTA, 100 mM TCEP, pH = 7.0) versetzt und mit 1 N NaOH ein pH-Wert von 6.0 eingestellt. Nach 1 h Inkubation unter Argonatmosphäre wird die Reaktion mit 200 µl 30 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure versetzt und durch Gelfiltration (Superdex Peptide PE (300x7.5) mit 25 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure als Laufmittel, Fluss von 0.2 ml/min) gereinigt. Die gesammelten Fraktionen mit dem Zilopeptid werden vereinigt und im Hochvakuum bis zur Trockne eingedampft. Es werden 0.33 mg an *RNase* 26-124, Asn34GlcNAc, [Met30Nle, Met31Nle] **29** erhalten.

LC-MS-Analyse von RNase Thz-26-124, Asn34GlcNAc, [Met30Nle, Met31Nle] und RNase 26-124, Asn34GlcNAc, [Met30Nle, Met31Nle]

Es wird jeweils 1 µl der Ligationslösung (2 Tage Reaktionszeit) und der Reaktion mit Methoxyamin (21 h Reaktionszeit) entnommen, in je 25 µl 10 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure gelöst und durch LC-MS analysiert.

Säule: YMC-Pack ODS-A S-3 µm (100x2.1 mm), Lösungsmittel A: Wasser mit 0.1 % Ameisensäure, Lösungsmittel B: Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure; Gradient: linear,

Start 10 % B, in 20 min auf 50 %, Flussrate 200 µl/min, UV-Detektion von 215 bis 275 nm;

RNase Thz-26-124, Asn34GlcNAc, [Met30Nle, Met31Nle] **28**

$C_{475}H_{754}N_{138}O_{156}S_9$ (11182.49)

$M_{ber} = 11175.28$

$M_{gef} = 1398.77 (M+8H)^{8+}, 1243.61 (M+9H)^{9+}$

RNase 26-124, Asn34GlcNAc, [Met30Nle, Met31Nle] **29**

Ausbeute: 0.33 mg (74 %)

$C_{474}H_{754}N_{138}O_{156}S_9$ (11170.47)

$M_{ber} = 11163.28$

$M_{gef} = 1397.14 (M+8H)^{8+}, 1242.01 (M+9H)^{9+}$

Synthese von RNase 1-124, Asn34GlcNAc, [Met30Nle, Met31Nle] **30**

In einem 1 ml Glasgefäß werden 0.13 mg (0.046 µmol) Thioester *RNase* 1-25 **18** und 0.33 mg (0.029 µmol) isoliertes Peptid *RNase* 26-124, Asn34GlcNAc, [Met30Nle, Met31Nle] **29** in 25 µl Ligationspuffer 3 (6 M GdmCl, 0.1 M Na₂HPO₄, 2 mM EDTA, 30 mM TCEP, 0.2 M MPAA, pH = 7.0) gelöst. Das Reaktionsgefäß wird unter Argonatmosphäre mit einem Schraubdeckel verschlossen und die Reaktionslösung nach einem Tag Inkubation bei 25 °C in einem anaeroben Zelt mittels LC-MS analysiert. Für die SDS-PAGE (vgl. 4.2.1.1) werden 2 µl entnommen, mit 25 µl dd-H₂O versetzt und durch Gelelektrophorese analysiert. Die Reaktionslösung (ca. 20 µl) wird mit 10 µl Ligationspuffer (6 M GdmCl, 0.1 M Na₂HPO₄, 2 mM EDTA, 100 mM TCEP, pH = 7.0) versetzt und mit 1 N NaOH ein pH-Wert von 6.0 eingestellt. Nach 1 h Inkubation unter Argonatmosphäre wird die Reaktion mit 200 µl 30 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure versetzt und durch Gelfiltration (Superdex Peptide PE (300x7.5) mit 25 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure als Laufmittel, Fluss von 0.2 ml/min) gereinigt. Die gesammelten Fraktionen mit dem Zielpепid **30** werden vereinigt und im Hochvakuum bis zur Trockne eingedampft. Als Ausbeute können 0.11 mg erhalten werden. Im Anschluss wird das synthetische Enzym rückgefaltet und ein Aktivitätstest durchgeführt (vgl. 4.2.1.10).

LC-MS-Analyse der Ligation zur RNase 1-124, Asn34GlcNAc, [Met30Nle, Met31Nle]

Es werden 2 µl der Ligationlösung entnommen, in 25 µl 10 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure gelöst und durch LC-MS untersucht.

Säule: YMC-Pack ODS-A S-3 µm (100x2.1 mm), Lösungsmittel A: Wasser mit 0.1 % Ameisensäure, Lösungsmittel B: Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure; Gradient: linear, Start 10 % B, in 20 min auf 50 %, Flussrate 200 µl/min, UV-Detektion von 215 bis 275 nm;

Ausbeute: 0.11 mg (27 %)

$C_{585}H_{926}N_{172}O_{198}S_{10}$ (13857.30)

$M_{\text{ber}} = 13848.49$

$M_{\text{gef}} = 1540.64 (M+9H)^{9+}$, $1386.53 (M+10H)^{10+}$

*Synthese von RNase Thz-26-124, Asn34Nona, [Met30Nle, Met31Nle] **32** und Thiazolidinöffnung zu RNase 26-124, Asn34Nona, [Met30Nle, Met31Nle] **33***

In einem 1 ml Glasgefäß werden 0.45 mg (0.135 µmol) Glycopeptidthioester RNase Thz-26-39, Asn34Nona, [Met30Nle, Met31Nle] **32** und 1.5 mg (0.15 µmol) vollständig SCE-geschütztes Fragment RNase 40-124 **3** in 100 µl Ligationspuffer 2 (6 M GdmCl, 0.1 M Na₂HPO₄, 2 mM EDTA, 30 mM TCEP, pH = 7.5) gelöst. Nach Zugabe von 3 % Thiophenol (3 µl, v/v) wird das Reaktionsgefäß unter Argonatmosphäre mit einem Schraubdeckel verschlossen und die Ligationlösung zwei Tage bei 25 °C in einem anaeroben Zelt inkubiert. Die Reaktion wird mittels LC-MS untersucht. Für die SDS-PAGE (vgl. 4.2.1.1) werden 2 µl entnommen, mit 25 µl dd-H₂O versetzt und die Reaktion durch Gelelektrophorese analysiert. Die Freisetzung des N-terminalen Cysteins erfolgt durch Mischen der Ligationlösung mit dem gleichen Volumen an Abspaltungslösung (6 M GdmCl, 0.1 M Na₂HPO₄, 2 mM EDTA, 30 mM TCEP, 0.2 M Methoxyamin pH = 2.0) und anschliessender Einstellung des pH-Wertes auf 3-4 mit 1 N HCl. Nach 20 h wird die Thiazolidinöffnung durch LC-MS kontrolliert. Die Reaktionslösung (ca. 200 µl) wird mit 40 µl Ligationspuffer (6 M GdmCl, 0.1 M Na₂HPO₄, 2 mM EDTA, 200 mM TCEP, pH = 7.0) versetzt und mit 1 N NaOH ein pH-Wert von 6.0 eingestellt. Nach 1 h Inkubation unter Argonatmosphäre wird die Reaktion mit 800 µl

30 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure versetzt und durch Gelfiltration (Superdex Peptide PE (300x7.5) mit 25 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure als Laufmittel, Fluss von 0.2 ml/min) gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielpeptid werden gesammelt und im Hochvakuum bis zur Trockne eingedampft. Als Ausbeute können 0.9 mg *RNase* 26-124, Asn34Nona, [Met30Nle, Met31Nle] **33** erhalten werden.

LC-MS-Analyse von RNase Thz-26-124, Asn34Nona, [Met30Nle, Met31Nle] und RNase 26-124, Asn34Nona, [Met30Nle, Met31Nle]

Es werden vor und nach der Behandlung mit Methoxyamin je 1 µl der Ligationslösung entnommen, in je 25 µl 10 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure gelöst und durch LC-MS analysiert.

Säule: YMC-Pack ODS-A S-3 µm (100x2.1 mm), Lösungsmittel A: Wasser mit 0.1 % Ameisensäure, Lösungsmittel B: Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure; Gradient: linear, Start 10 % B, in 20 min auf 50 %, Flussrate 200 µl/min, UV-Detektion von 215 bis 275 nm;

RNase Thz-26-124, Asn34Nona, [Met30Nle, Met31Nle] 32

$C_{529}H_{843}N_{141}O_{196}S_9$ (12602.77)

$M_{\text{ber}} = 12594.78$

$M_{\text{gef}} = 1576.29 (M+8H)^{8+}, 1401.23 (M+9H)^{9+}$

RNase 26-124, Asn34Nona, [Met30Nle, Met31Nle] 33

Ausbeute: 0.90 mg (48 %)

$C_{528}H_{843}N_{141}O_{196}S_9$ (12590.76)

$M_{\text{ber}} = 12582.78$

$M_{\text{gef}} = 1574.22 (M+8H)^{8+}, 1399.53 (M+9H)^{9+}$

Synthese von RNase 1-124, Asn34Nona, [Met30Nle, Met31Nle] 34

In einem 1 ml Glasgefäß werden 0.25 mg (0.089 µmol) Thioester *RNase* 1-25 **18** und 0.9 mg (0.071 µmol) isoliertes Peptid *RNase* 26-124, Asn34Nona, [Met30Nle, Met31Nle] **33** in 60 µl Ligationspuffer 3 (6 M GdmCl, 0.1 M Na₂HPO₄, 2 mM EDTA, 30 mM TCEP,

0.2 M MPAA, pH = 7.0) gelöst. Das Reaktionsgefäß wird unter Argonatmosphäre mit einem Schraubdeckel verschlossen und die Ligationslösung nach einem Tag Inkubation bei 25 °C in einem anaeroben Zelt mittels LC-MS analysiert. Für die SDS-PAGE (vgl. 4.2.1.1) werden 2 µl entnommen, mit 25 µl dd-H₂O versetzt und durch Gelelektrophorese untersucht. Die Reaktionslösung wird direkt rückgefaltet, das Zielprotein **34a** isoliert und ein Enzymassay zur Bestimmung der Aktivität durchgeführt (vgl. 4.2.1.11).

LC-MS-Analyse der Ligation zu RNase I-124, Asn34Nona, [Met30Nle, Met31Nle]

Es werden 2 µl der Ligationslösung entnommen, in 25 µl 10 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure gelöst und durch LC-MS untersucht. Die Reinheit des nativen Enzyms wird nach der Gelfiltration durch Lösen von 0.01 mg **34a** in 10 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure und Analyse mittels LC-MS untersucht.

Säule: YMC-Pack ODS-A S-3 µm (100x2.1 mm), Lösungsmittel A: Wasser mit 0.1 % Ameisensäure, Lösungsmittel B: Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure; Gradient: linear, Start 10 % B, in 20 min auf 50 %, Flussrate 200 µl/min, UV-Detektion von 215 bis 275 nm;

*RNase I-124, Asn34Nona, [Met30Nle, Met31Nle] **34***

C₆₃₉H₁₀₁₅N₁₇₅O₂₃₈S₁₀ (15277.45)

M_{ber} = 15267.87

M_{gef} = 1698.47 (M+9H)⁹⁺, 1528.77 (M+10H)¹⁰⁺

*Native RNase I-124, Asn34Nona, [Met30Nle, Met31Nle] **34a***

Ausbeute: 0.77 mg (71 %, rückgefaltetes Produkt nach Gelfiltration)

C₆₃₉H₁₀₀₇N₁₇₅O₂₃₈S₁₀ (15269.45)

M_{ber} = 15259.87

M_{gef} = 1697.75 (M+9H)⁹⁺, 1528.15 (M+10H)¹⁰⁺

4.2.1.10. Rückfaltung der synthetischen Enzyme

Vor der Rückfaltung werden die isolierten Proteine Met-*RNase* 1-124 **5**, Met-*RNase* 1-124, (SCE)₈ **14**, *RNase* 1-124, [Asn34Pra] **26** und *RNase* 1-124, Asn34GlcNAc, [Met30Nle, Met31Nle] **30** zunächst vollständig denaturiert und reduziert. Dazu werden die lyophilisierten Produkte in je 25 µl Denaturierungspuffer (6 M GdmCl, 0.1 M Tris, 2 mM EDTA, 0.2 M GSH, pH = 8.5) für zwei Stunden bei 1100 rpm/25 °C in einem Thermomixer inkubiert. Die Rückfaltung wird im Anschluss durch 60-fache Verdünnung mit 1775 µl Renaturierungspuffer (0.1 M Tris, 2 mM EDTA, 0.3 mM GSSG, pH = 8.5) eingeleitet. Nach einem Tag Inkubation bei 25 °C und wird die enzymatische Aktivität bestimmt (vgl. 4.2.1.11)

Zur Rückfaltung von *RNase* 1-124, Asn34Nona, [Met30Nle, Met31Nle] **34**, wird das restliche Volumen an Ligationslösung direkt 60-fach mit Renaturierungspuffer (0.1 M Tris, 2 mM EDTA, 0.3 mM GSSG, pH = 7.7) versetzt und 4 d bei 25 °C inkubiert. Im Anschluss wird die Lösung mit 90 % Acetonitril auf eine Konzentration von 25 % CH₃CN gebracht und das native Produkt **34a** durch Gelfiltration (Superdex Peptide PE (300x7.5) mit 25 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure als Laufmittel, Fluss von 0.2 ml/min) gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprotein werden gesammelt und im Hochvakuum bis zur Trockne eingedampft. Als Ausbeute können 0.77 mg native **34a** erhalten werden, mit denen ein Aktivitätstest durchgeführt wird (vgl. 4.2.1.11).

4.2.1.11. Aktivitätstest der rückgefalteten Ligationsprodukte

Die Bestimmung der Aktivität der verschiedenen synthetischen Varianten der bovinen *Ribonuclease* wird mit Hilfe des Enzymassays von Crook *et al.* durchgeführt.^[101] Unter Verwendung von cyclischem 2',3'-CMP als Substrat wird die Absorptionsänderung bei 292 nm gemessen. In einer Quarzküvette werden 1.6 ml einer Lösung von 50 mM Natriumcacodylat mit 0.3 mg/ml cyclischem 2',3'-CMP, pH = 7.0 vorgelegt, mit 100 µl der jeweiligen Rückfaltungslösungen von **5**, **14**, **26** und **30** (vgl. 4.2.1.10) versetzt und unter Rühren (800 rpm) über 3 Minuten mit einem UV/VIS-Dioden Array Spektrometer die Absorptionsänderung bei 292 nm gemessen.

Für die Aktivitätsbestimmung von **34a** werden 0.05 mg des isolierten Produktes in 100 µl von 50 mM Natriumcacodylat, pH = 7.0 gelöst, zu 1.6 ml eines 50 mM Natriumcacodylatpuffers mit 0.3 mg/ml cyclischem 2',3'-CMP in einer Quarzküvette gegeben und

unter Rühren (800 rpm) über 3 Minuten die Absorptionsänderung bei 292 nm gemessen. Es kann ein $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert von $8.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden.

4.2.1.12. Bestimmung des Molekulargewichtes

Es wird mit einem Micromass LCT ESI-TOF Spektrometer gearbeitet, das mit einer Agilent HP 1100 HPLC mit Diodenarray-Detektor gekoppelt ist. Für HPLC-MS-Läufe wird eine C18-Säule verwendet (YMC-Pack ODS-A, 120 Å, S-03 µm) wobei als Lösungsmittel Gemische von Acetonitril in Wasser mit jeweils 0.1 % Ameisensäure (v/v) zum Einsatz kommen. Gaseinlass wird über eine Spritzenpumpe in 10 % Acetonitril/0.1 % Ameisensäure durchgeführt.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1. Gewinnung von *RNase* 40-124

Mit Hilfe des pTWIN-Expressionssystems ist es durch Anwendung der N-terminalen Fusion möglich, Peptide mit einem von Methionin verschiedenen N-Terminus zu gewinnen. In dieser Arbeit sollte auf diese Weise das Fragment *RNase* 40-124 **B** mit einem N-terminalen Cystein hergestellt werden. Nach den in Abschnitt 3 beschriebenen Synthesestrategien sollte mit diesem Fragment die Synthese von Volllängen Met-*RNase* 1-124 sowie verschiedenen glycosylierten Varianten durch native chemische Ligation mit den jeweiligen Thioestern ermöglicht werden. Das zur Expression des entsprechenden Fusionsproteins benötigte Genfragment wurde bereits in einer früheren Arbeit mittels 2-Stufen-PCR synthetisiert und nach Behandlung mit geeigneten Restriktionsenzymen in den pTWIN-Vektor kloniert.^[102] Das als pTWIN1^{cp1} bezeichnete Plasmid wurde durch Elektroporation in *E. coli* eingeschleust und mit dem gewonnenen Klon konnte direkt die Expression des Fusionsproteins aus CBD, Ssp Dna B-Intein und *RNase* 40-124 initiiert werden. Durch das Auftreten von sog. *Inclusion Bodies* (vgl. 5.1.2) kam eine Affinitätsreinigung und Inteinspaltung auf einer Chitinsäule nicht in Betracht. Eine neue Strategie wurde deshalb entwickelt, die aus Präparation (Waschen) der *Inclusion Bodies*, Reduktion, Denaturierung und anschließender Rückfaltung mit Inteinspaltung bestand (vgl. 5.1.3).

5.1.1. Expression des Fusionsproteins und Lyse

Da die Parameter Expressionsdauer und Expressionstemperatur bereits optimiert wurden, konnte direkt mit der Gewinnung von größeren Mengen an Fusionsprotein begonnen werden. Zur präparativen Expression des Fusionsproteins wurde der Klon mit dem pTWIN1^{cp1}-Plasmid in 10 l ampicillinhaltigem LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6-0.9 kultiviert und mit 0.75 mM IPTG induziert. Nach 3 h wurden die Zellen geerntet, das erhaltene Bakterienpellet in kaltem B1-Puffer resuspendiert und unter ständiger Kühlung mit Hilfe eines Microfluidizers unter Druck aufgeschlossen. Die Suspension und der Überstand der Lyse wurden mittels SDS-PAGE untersucht und man konnte feststellen, dass das Fusionsprotein ausschließlich im Pellet und nicht im Überstand des zentrifugierten Lysats zu finden war (vgl. Abbildung 14).

5.1.2. *Inclusion Body* Präparation und Denaturierung

Bei der heterologen Überexpression von fremden Genen mittels rekombinanter DNA-Technologie in *E. coli* kommt es oftmals zur Bildung von sog. *Inclusion Bodies*.^[103] Dabei handelt es sich um dicht gepackte, meist amorphe Aggregate aus missgefalteten Proteinen, die keine biochemische Aktivität besitzen.^[104] Das Auftreten von *Inclusion Bodies* ist dabei kaum vorhersagbar, da es keine direkte Verbindung mit Faktoren wie Proteinsequenz, Grösse, Hydrophobie oder Faltungsweg gibt.^[105] Man vermutet, dass es bei einer Expressionsrate des Zielproteins von über 2 % der Gesamtproteinmenge zur Bildung von *Inclusion Bodies* kommt.^[106] Bei einer solch hohen Überexpression ist die Menge an verfügbaren Chaperonen der limitierende Faktor.^[107] Thermischer und oxidativer Stress sowie Mutationen durch RNA-Modifikation oder fehlerhafte Translation können ebenfalls zur Proteinaggregation beitragen.^[108] Weiterhin beeinflussen die Expressionsbedingungen, also Temperatur, pH-Wert, Induktionsrate, Sauerstoffkonzentration oder die Kohlenstoffquelle, die Entstehung von *Inclusion Bodies*.^[109,110] Bei der Wahl eines T7 Promotorsystems konnte vermehrt die Bildung von IBs beobachtet werden.^[111] Im Fall von Proteinen mit Disulfidbrücken ist vermutlich das reduzierende Milieu des Cytosols für die Entstehung von *Inclusion Bodies* verantwortlich, da es die Ausbildung der Disulfide verhindert. Oft kann trotz der Optimierung der gerade genannten Faktoren das Auftreten von unlöslichem Zielprotein nicht verhindert werden. Die Expression als *Inclusion Bodies* hat jedoch einige Vorteile:^[112] 1) Oftmals erhält man eine sehr hohe Expressionsrate von bis zu 30 % der Gesamtproteinmenge 2) Das Zielprotein ist weitgehend vor proteolytischem Abbau geschützt 3) Die Trennung von löslichen Proteinen durch Zentrifugation oder Filtration ist einfach und schnell 4) Toxische Proteine, die normalerweise die Wirtszelle abtöten, können auf diese Weise exprimiert werden. Ein weiterer positiver Effekt ist die Tatsache, dass *Inclusion Bodies* vorwiegend aus dem gewünschten Zielprotein bestehen.^[113] Als Verunreinigungen treten meist andere intrazelluläre Proteine (z.B. Elongationsfaktor EF-Tu), DNA, ribosomale RNA oder Phospholipide auf, welche durch verschiedene Wasch- und Pelletierungsschritte entfernt werden können.^[114] Die Reinheit der *Inclusion Bodies* kann unter optimalen Bedingungen am Ende der Präparation bis zu 90 % und mehr erreichen. Der erste Schritt der *Inclusion Body* Präparation besteht normalerweise in einem Zentrifugationsschritt des Zelllysates nach Zellaufschluss bei 15000-30000 g. Dadurch können die relativ dichten IBs von löslichen Komponenten abgetrennt werden.^[115] Zur Entfernung von restlichen

Zellwandbestandteilen wurde im ersten Waschschrift Lysozym (Zellwandlyse) und Desoxycholat (Binden von Membranproteinen) zugesetzt. Die Abtrennung von stark adsorbierten Proteinen kann auch mit einer Mischung aus chaotropen Reagenzien wie Harnstoff oder Guanidiniumchlorid und Detergentien wie Triton X-100, Berol 185 oder Octylglucosid erreicht werden.^[116,117] Dabei muss die kritische Konzentration der chaotropen Reagenzien beachtet werden, ab der die *Inclusion Bodies* selbst in Lösung übergehen.

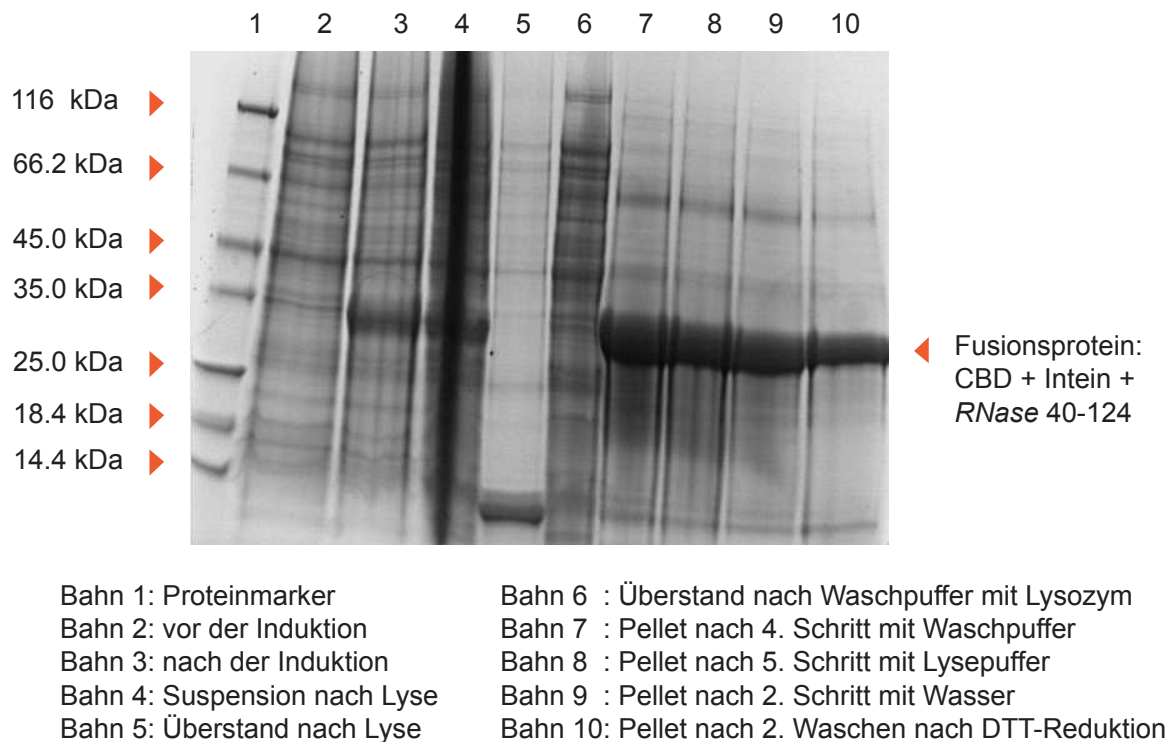


Abbildung 14. Ausschnitt aus der *Inclusion Body* Präparation

Nach dem Waschschrift mit Lysozym wurde noch dreimal mit Waschpuffer ohne Lysozym resuspendiert und pelletiert. Im Anschluss folgten fünf Schritte mit Lysepuffer B1 und zwei Schritte mit dd-H₂O. Nach jedem Waschschrift wurden von der Suspension und vom Überstand Aliquots entnommen und mittels SDS-PAGE untersucht. So konnte der Reinigungsprozess verfolgt und gleichzeitig überprüft werden, ob die IBs in eine lösliche Form zu überführen waren. Die steigende Qualität der *Inclusion Bodies* ist in Abbildung 14 zu sehen. Dabei ist im Vergleich zum ursprünglichen Zelllysate eine deutliche Abnahme an Verunreinigungen zu erkennen (Bahn 4 bzw. 10). Speziell nach dem Resuspendieren mit Desoxycholat und Lysozym konnte ein Großteil der Fremdproteine in den Überstand gebracht werden (Bahn 6). Nach dem zweiten Waschschrift mit dd-H₂O wurden die

Inclusion Bodies zunächst mit 100 mM DTT in B1-Puffer reduziert. Die vorher hellbraunen IBs wurden dadurch fast weiss. Cysteinhaltige *Inclusion Bodies* enthalten meist inter- und intramolekulare Disulfidbrücken, welche die Löslichkeit deutlich herabsetzen können. Durch Zugabe von Reduktionsmitteln wie DTT, DTE, Glutathion oder β -Mercaptoethanol kommt es zur Reduktion der IBs und einer Verbesserung der Löslichkeit.^[118] Danach wurde zweimal mit B1-Puffer gewaschen. Da es sich bei der späteren Rückfaltung des Fusionsproteins (vgl. 5.1.3) nicht um eine oxidative Rückfaltung handelt, ist die komplette Entfernung des Reduktionsmittels, z.B. durch Dialyse, nicht notwendig. Nach dem Waschen wurden die reduzierten *Inclusion Bodies* mit Denaturierungslösung (6 M Guanidiniumchlorid, 2 mM EDTA, 1 mM TCEP, pH = 8.0) gelöst. Neben TCEP als Reduktionsmittel kam zusätzlich EDTA als Chelatbildner zum Einsatz, um die metallkatalysierte Oxidation der Thiole durch Luftsauerstoff zu verhindern. Bei Verwendung von Harnstoff als Chaotrop kann es bei längerer Exposition zur Carbamoylierung von Aminogruppen durch Isocyanat Spuren kommen.^[119] Zur Denaturierung wurden in der Literatur alternative Solubilisierungsreagenzien wie Cetyltrimethylammoniumchlorid, *N*-Lauroylsarcosin, SDS oder Thiocyanatsalze beschrieben.^[120] Das Auflösen mit Temperatur- oder Druckänderungen ist ebenfalls möglich. Im Anschluss wurde der pH-Wert des gelösten Fusionsproteins auf 3 abgesenkt und Reste von unlöslichen Bestandteilen (v.a. Zelltrümmer) abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 N NaOH neutralisiert und die Proteinkonzentration nach *Bradford* auf 132 mg/ml bestimmt (vgl. 4.2.1.5). Dies ergab bei einem verwendeten Volumen von 14 ml an Denaturierungspuffer eine Gesamtproteinmenge von 1.85 g in den gelösten *Inclusion Bodies*.

5.1.3. Rückfaltung und Inteinspaltung

Die zuvor erwähnten Vorteile der Bildung von *Inclusion Bodies* kommen nur dann zum Tragen, wenn aus den denaturierten Aggregaten wieder native Proteinstrukturen gewonnen werden können. Dies wird durch die Anwendung von verschiedenen *in vitro* Rückfaltungstechniken erreicht. Die Rückfaltung wird dabei durch die kontrollierte Senkung der Konzentration an Denaturierungsmittel eingeleitet, was durch Dialyse oder Verdünnung erfolgt. Bei allen Rückfaltungen sollte eine hohe lokale Konzentration an teilgefalteten Intermediaten vermieden werden, da es sonst zur Aggregation bei abnehmender Konzentration an chaotropem Reagenz kommen kann. Dies kann durch starkes Rühren in einer größeren Menge Rückfaltungspuffer oder durch sog. Pulsrenaturierung gewährleistet

werden.^[121] Generell ist die Faltungsausbeute für ein gegebenes Protein immer von Umgebungsparametern wie Proteinkonzentration, Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke und dem Zusatz von chaotropen Agenzien und niedermolekularen Additiven abhängig. Als Additive können nicht denaturierende Konzentrationen von GdmCl oder Harnstoff,^[122] Chaps,^[123] Mischungen von Phospholipiden und Triton X-100,^[124] Laurylmaltosid,^[125] Tris,^[126] Glycerin, Metallionen oder PEG 4000 verwendet werden,^[127] wobei der Mechanismus der Rückfaltungshelfer bislang kaum verstanden ist. Bei Verwendung von PEG kann es auf Grund von amphiphilen Wechselwirkungen zur Adsorption an das Protein kommen, was zusätzliche Reinigungsschritte erfordert.^[128] Das auch in dieser Arbeit verwendete L-Arginin wird in letzter Zeit sehr häufig als „universeller“ Rückfaltungshelfer betrachtet,^[129] wobei seine Wirkung in der Hemmung der Aggregation durch Erhöhung der Löslichkeit von Intermediaten zu bestehen scheint und nicht in der direkten Beschleunigung der Rückfaltung.^[130]

Die Strategie zur Gewinnung des Fragments *RNase* 40-124 ist in Abbildung 15 dargestellt. Nach der Expression des Fusionsproteins wurden die *Inclusion Bodies* gewaschen, denaturiert und anschließend rückgefaltet, um die Inteinspaltungsreaktion zu ermöglichen. Dazu wurden die gelösten IBs unter Argon in einem Kolben vorgelegt und durch Zutropfen von entgastem Rückfaltungspuffer die Rückfaltung durch langsames Verdünnen eingeleitet. Obwohl die Spaltung des *Ssp* Dna B-Inteins bei einem pH von kleiner als 7 stattfindet, wurde die Rückfaltung bei einem pH-Wert von 7.4 durchgeführt. Dieser liegt über dem isoelektrischen Punkt von 6.71 des Fusionsproteins aus CBD 1, Intein 1 und *RNase* 40-124. Dies sollte sich positiv auf die Rückfaltung auswirken, da die Aggregationstendenz normalerweise bei einem pH-Wert abseits vom isoelektrischen Punkt des Proteins abnimmt.^[131] Der Puffer enthielt neben L-Arginin auch TCEP als Reduktionsmittel, um die aggregationsfördernde Bildung von Disulfiden zu unterdrücken. Die *Inclusion Bodies* wurden zunächst bis zu einer GdmCl-Konzentration von 0.2 M verdünnt. Davon wurden 100 µl entnommen und auf einen pH-Wert von 6.9 eingestellt. Die restlichen IBs wurden bis auf 0.1 M GdmCl verdünnt und der pH-Wert auf 6.9 gesenkt. Von beiden Verdünnungen wurden nach einer Minute und nach 24 h Proben für die SDS-PAGE entnommen (vgl. 4.2.1.1). In der Lösung konnte während der Verdünnung optisch keine Trübung bzw. Aggregation beobachtet werden. Zum Nachweis, ob die Rückfaltung erfolgreich war und natives Protein erhalten wurde, sind spezielle analytische Methoden nötig. Dabei kann es sich z.B. um einen Enzymassay handeln, bei dem die Aktivität durch

Umsatz eines Substrates und damit verbundene spektroskopische Änderungen gemessen wird.

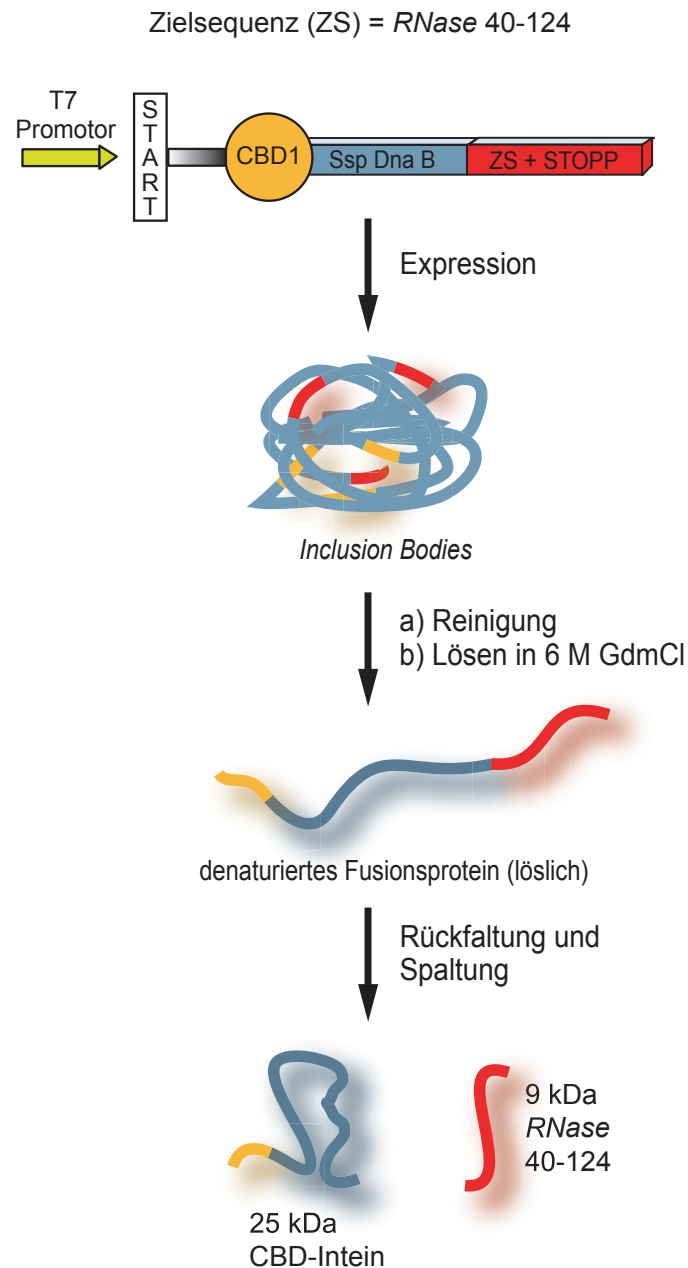


Abbildung 15. Strategie zur Gewinnung von RNase 40-124

Therapeutische Proteine können mit Immunoassays nachgewiesen werden, wenn geeignete Antikörper existieren. Weitere Möglichkeiten bietet die Fluoreszenzmessung, wenn interne aromatische Aminosäuren im Protein vorkommen oder die Messung des Circular dichroismus, der Aufschluss über die Sekundärstruktur gibt. Durch limitierte Proteolyse gewinnt man Informationen über die Kompaktheit der nativen Struktur. Im Fall der Inteinrückfaltung ist die Analyse vereinfacht, da nur korrekt renaturiertes Intein

autokatalytische Aktivität besitzt und es somit durch die Rückfaltung und anschließende Spaltung zu einer Veränderung der Größe des Fusionsproteins kommt. Da aus einem Protein zwei kleinere Peptide entstehen, kann die Rückfaltung mittels SDS-PAGE analysiert werden. Voraussetzung ist, dass alle Proteine, die korrekt zurückfalten, auch die anschließende Spaltreaktion eingehen.

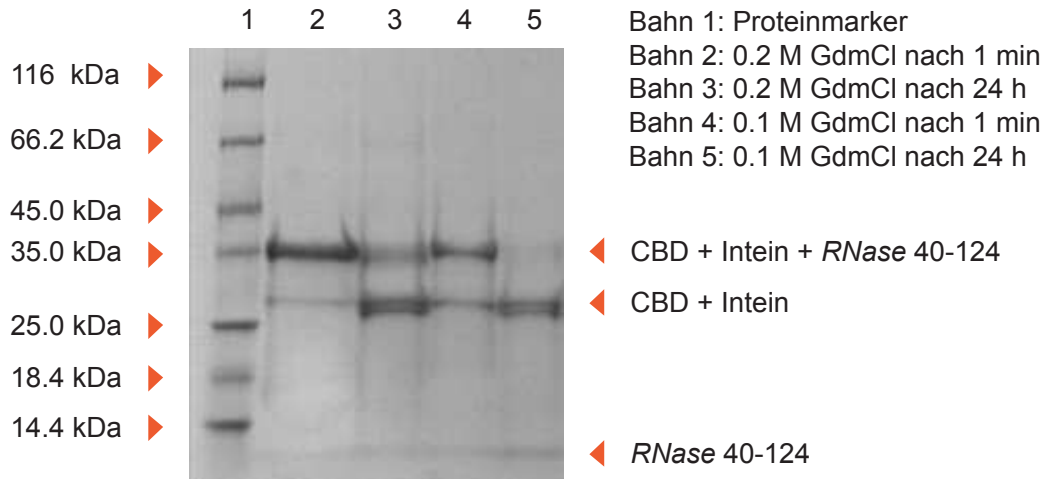


Abbildung 16. Rückfaltung und Spaltung des Fusionsproteins

Die Effizienz der Spaltung ist in Abbildung 16 zu sehen. Dabei war zu erkennen, dass nach einer Minute bei einem pH-Wert von 6.9 fast keine Spaltung nachgewiesen werden konnte. Dagegen war die Spaltung nach 24 h deutlich ausgeprägt. Ob die Rückfaltung oder die Spaltreaktion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, konnte nicht geklärt werden. Zu erkennen ist das 25 kDa Fragment aus CBD und Intein sowie das 9 kDa Zielpепtid *RNase* 40-124. Der Vergleich von Bahn 3 und 5 zeigt außerdem, dass die Spaltungseffizienz bei einer Konzentration von 0.1 M GdmCl höher war als bei 0.2 M GdmCl. Bei einer Verdünnung bis auf 0.1 M GdmCl nach einer Spaltdauer von 24 h zeigte sich eine nahezu vollständige Spaltung des Fusionsproteins.

Trotz dieser anfänglich vielversprechenden Ergebnisse war es nicht möglich, das gewünschte Fragment *RNase* 40-124 zu isolieren bzw. massenspektrometrisch nachzuweisen. Es wurde zunächst von einer Oxidation des Zielfragmentes ausgegangen, das sieben Cysteine enthält. Reduktionsversuche in Harnstoff oder GdmCl blieben jedoch erfolglos (nicht gezeigt). Zur Gewinnung des Fragmentes *RNase* 40-124 wurde deshalb eine neue Strategie entwickelt, die auf der Modifikation der Cysteine durch Bildung von gemischten Disulfiden beruhte.

5.1.4. Modifikation des Fusionsproteins, Rückfaltung und Inteinspaltung

Die oxidative Rückfaltung von Proteinen unter Disulfidbrückenbildung ist in einigen Fällen durch die geringe Löslichkeit des reduzierten, denaturierten Peptids beeinträchtigt. Dadurch kann es zu vermehrter Aggregation zu Beginn der Rückfaltung kommen. Zwar ist für die Spaltung des Inteins nur dessen korrekte Tertiärstruktur verantwortlich, jedoch faltet sich das 85 Aminosäuren große Fragment 40-124 der *RNase* bei Entfernung des Denaturierungsmittels ebenfalls partiell zurück. Dabei handelt es sich zunächst nicht um eine oxidative Rückfaltung, da der Rückfaltungspuffer TCEP als Reduktionsmittel enthält. Unter einer bestimmten Konzentration an GdmCl ist es jedoch möglich, dass es trotz reduzierender Bedingungen zu einer irreversiblen Bildung von Disulfiden kommt, da diese sich im Inneren einer kompakten Proteinstruktur befinden können und dann für eine Reduktion nicht mehr zugänglich sind. Da es sich bei dem 40-124 Peptid nur um einen Teil der *RNase* mit sieben Cysteinen handelt, kann es nicht zur Ausbildung der vier nativen Disulfidbrücken kommen. Da die Spaltung des Fusionsproteins vollständig war, könnte es nach der Spaltung zu einer Aggregation von bereits oxidiertem und partiell rückgefaltetem Zilopeptid *RNase* 40-124 kommen. Auch bei einem vollständig reduzierten Zustand könnte die schlechte Löslichkeit des cysteinreichen Fragments zu einer Aggregation und den damit verbundenen Problemen bei der Isolierung führen. Zur Verbesserung der Löslichkeit und zur Vermeidung der Oxidation sollten deshalb die Cysteine mit einer Schutzgruppe versehen werden. Die selektive Schützung von Cysteinen in einem Protein ist leicht durchführbar, da das Thiolatanion die nucleophilste Gruppe in Proteinen ist. Eine häufig verwendete Modifikation ist dabei die Bildung von gemischten Disulfiden, zum Beispiel mit Glutathion.^[132] Alternativ können Cysteine *S*-sulfonyliert^[133] oder mit Iodessigsäure carboxymethyliert werden,^[134] wobei die letztgenannte Modifikation irreversibel ist. Dagegen sind aus gemischten Disulfiden und *S*-sulfonylierten Thiolen durch ein Reduktionsmittel die Cysteine regenerierbar.

Durch Modifikation der Cysteine über gemischte Disulfide sollte das Fusionsprotein zunächst geschützt werden, um das modifizierte Fragment *RNase* 40-124 zu gewinnen (vgl. Abbildung 17). Dazu wurde das denaturierte, frisch reduzierte Fusionsprotein mit einem Überschuss an Disulfid versetzt und anschließend die Rückfaltung eingeleitet. In diesem Fall durfte der Rückfaltungspuffer kein Reduktionsmittel enthalten, da es sonst zu einer Entschützung der Cysteine kommen würde. Für die Bildung von gemischten Disulfiden sollten die zu modifizierenden Cysteine in reduzierter Form vorliegen. Mechanistisch verläuft die Reaktion über einen nucleophilen Angriff des deprotonierten Proteinthiolat-

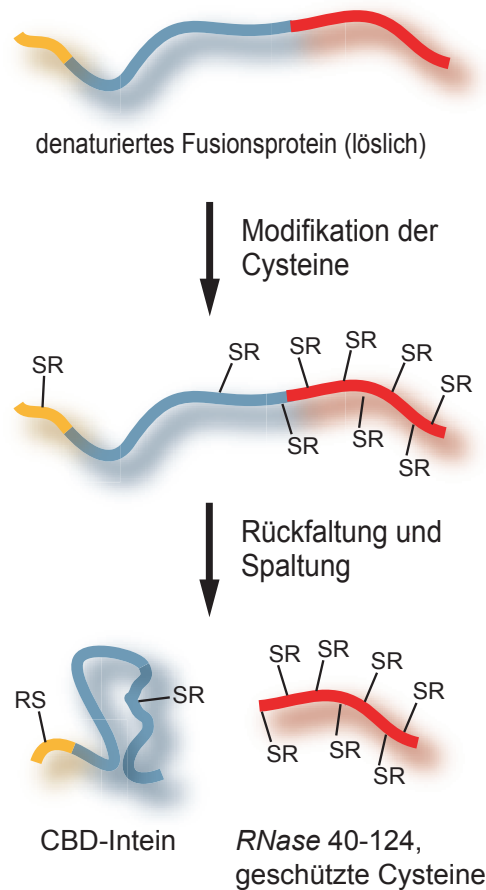


Abbildung 17. *Modifikation der Cysteine, Rückfaltung und Spaltung*

anions auf ein internes Schwefelatom des niedermolekularen Disulfides unter Freisetzung eines Thiolats (vgl. Abbildung 18). Thiole mit niedrigerem pK_a -Wert fungieren als bessere Nucleophile (sind also reaktiver) da sie bereits bei neutralem pH-Wert deprotoniert vorliegen. Deshalb wird zur Bildung gemischter Disulfide in der Regel ein leicht basischer pH-Wert verwendet.

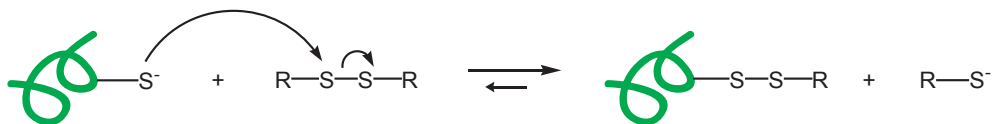


Abbildung 18. *Mechanismus der Bildung gemischter Disulfide*

Zunächst wurde versucht, die *Inclusion Bodies* mit oxidiertem Glutathion zu modifizieren. Dadurch könnten mehrere geladene Gruppen ins Protein eingeführt werden, die die Löslichkeit verbessern sollten. Allerdings könnten dabei folgende Probleme auftreten: Erstens enthalten die CBD und das Ssp Dna B-Intein je ein Cystein. Diese bilden im

nativen Zustand keine Disulfidbrücke aus und das Cystein des Inteins ist nicht am Katalysemechanismus der Inteinspaltung beteiligt, jedoch könnte die Einführung von zwei Glutathioneinheiten einen Einfluss auf die Struktur bzw. Faltung von CBD und Intein haben. Die Rückfaltung könnte damit beeinträchtigt oder vollständig blockiert werden. Ein zweites Problem könnte am N-terminalen Cystein des *RNase* Peptids entstehen. Die Spaltungseffizienz des Inteins kann von der Aminosäure neben der Spaltstelle beeinflusst werden.^[135] Durch Einführung eines Glutathionrestes in Nachbarschaft zum C-terminalen Asparagin des Inteins könnte also selbst bei vollständiger Rückfaltung die Spaltung des Inteins und damit die Freisetzung des Zielpeptids limitiert werden. Deshalb wurde als Alternative das kleinere Disulfid 3,3'-Dithiodipropionsäure verwendet. Durch die Einführung der geladenen 2-Carboxyethylthiogruppe sollte eine erhöhte Löslichkeit des Zielproteins unter reversibler Blockierung der Cysteine resultieren.

Zur vollständigen Reduktion wurden die gelösten *Inclusion Bodies* zunächst mit TCEP versetzt und anschließend bei basischem pH-Wert ein Überschuss an Disulfid (GSSG bzw. 3,3'-Dithiodipropionsäure) zugegeben und über Nacht unter Argon inkubiert. Die Rückfaltung erfolgte im Anschluss bei einem pH von 7.4 unter den typischen Bedingungen, allerdings ohne TCEP im Rückfaltungspuffer, um die gemischten Disulfide zu erhalten. Beim Zutropfen der Rückfaltungslösung konnte ab einer GdmCl-Konzentration von 2 M eine leichte Trübung der Lösung und eine geringfügige Proteinaggregation beobachtet werden. Nach Absenken des pH-Wertes auf 6.9 und einer Spaltungsdauer von jeweils zwei Tagen wurden die entsprechenden Rückfaltungsansätze mittels SDS-PAGE untersucht (Abbildung 19).

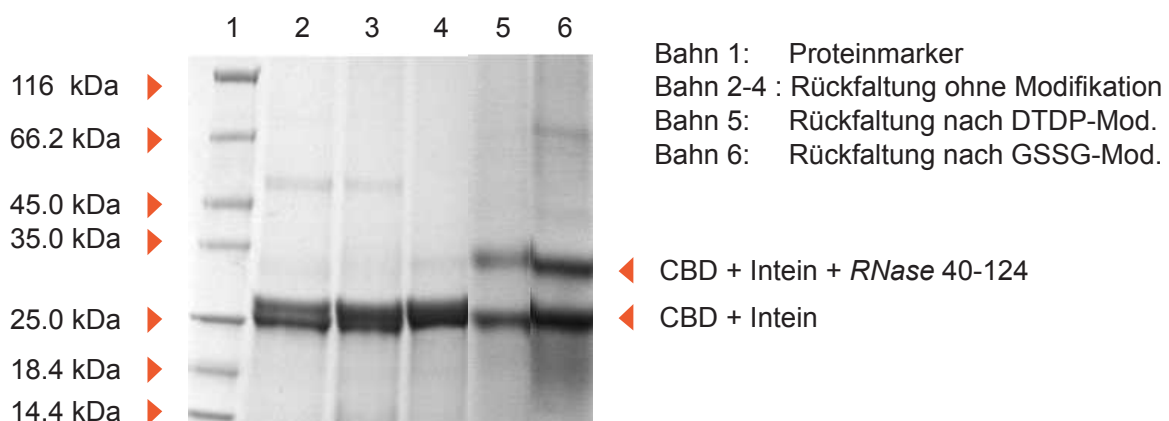


Abbildung 19. Rückfaltung nach Modifikation mit DTDP und GSSG

Im Vergleich zur Rückfaltung der unmodifizierten *Inclusion Bodies* unter reduzierenden Bedingungen konnte dabei eine deutliche Abnahme der Spaltungseffizienz beobachtet werden. Ob dies an einer Beeinflussung der Rückfaltung oder einer Blockierung der Spaltstelle durch die eingeführte Schutzgruppe am benachbarten Cystein lag, konnte durch diese Experimente nicht geklärt werden. Auch eine unvollständige Modifikation der Cysteine unter anschließender Oxidation zu inter- und intramolekularen Disulfiden bei der nichtreduzierenden Rückfaltung kommt als Erklärung in Betracht (vgl. 5.1.5). Da das Verhältnis von ungespaltenem zu gespaltenem Fusionsprotein bei der Glutathion- und bei der 2-Carboxyethylthiomodifikation ähnlich war, wurde in erster Linie ein direkter Einfluß der Schutzgruppen auf die Rückfaltung vermutet.

Der isoelektrische Punkt kann, wie bereits erwähnt, den idealen pH-Wert der Rückfaltung des entsprechenden Proteins beeinflussen. Deshalb wurde nach der Modifikation des Fusionsproteins mit 3,3'-Dithiodipropionsäure eine Rückfaltungsreihe bei verschiedenen pH-Werten erstellt. Dabei wurde ein pH-Bereich von 4.5 bis 8.5 untersucht. Ersetzt man für die Berechnung des IEP die neun im Fusionsprotein gebildeten gemischten Disulfide mit der strukturell vergleichbaren Aminosäure Glutamat, erhält man einen IEP von 5.4. Bei allen Ansätzen wurde der pH-Wert am Ende der Rückfaltung auf 6.9 eingestellt, da nur bei einem pH von 6.5-7.0 eine Spaltung des Inteins initiiert werden kann, wogegen die Rückfaltung unabhängig von der Spaltung bei einem anderen pH-Wert durchführbar ist. Die Rückfaltungslösungen bei pH 6.5, 7.5 und 8.5 zeigten eine geringe Trübung, bei

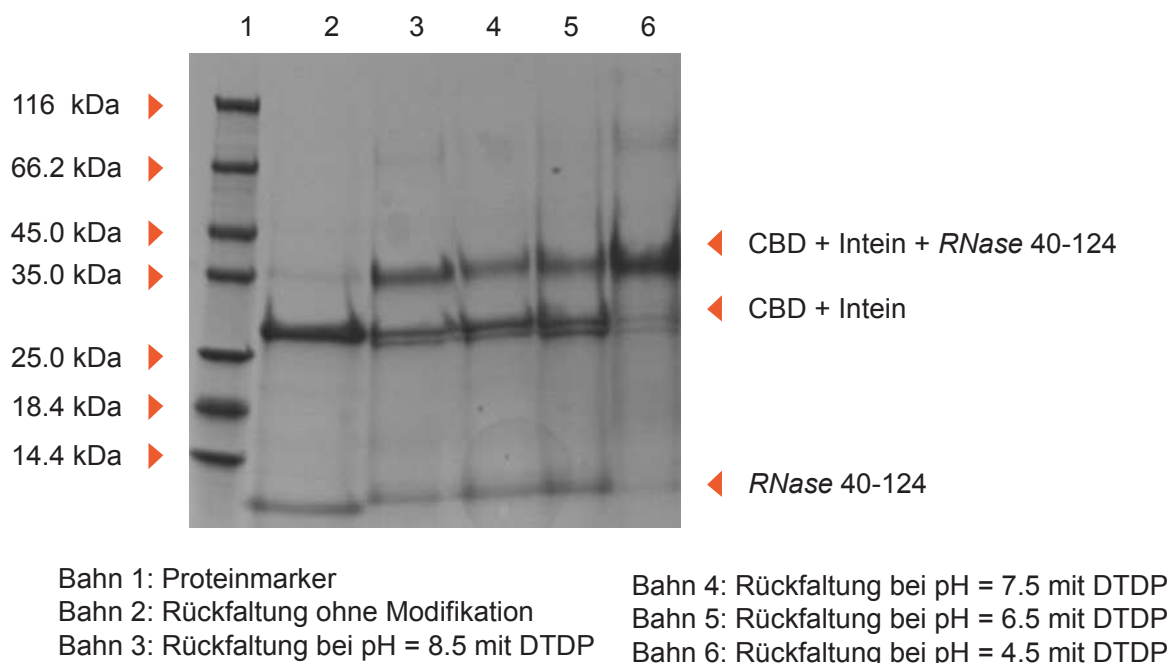


Abbildung 20. Rückfaltung nach Modifikation mit DTDP in Abhängigkeit vom pH

einem pH-Wert von 4.5 aggregierte das Fusionsprotein nahezu vollständig. Daher konnte bei diesem Ansatz praktisch keine Spaltung nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 20). Die Spaltung nach Rückfaltung bei den anderen drei pH-Werten verlief besser, wobei die Spaltung nach Rückfaltung bei einem pH von 8.5 etwas weniger ausgeprägt war. Jedoch konnte generell keine Spaltungseffizienz von über 50 % erreicht werden.

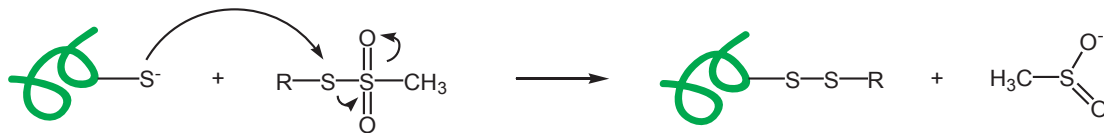


Abbildung 21. Mechanismus der Bildung gemischter Disulfide mit Thiosulfonaten

Zur Bildung gemischter Disulfide mit Proteinen können neben niedermolekularen Disulfiden auch sog. Alkyl-alkanthiosulfonate verwendet werden.^[136] Diese Methode verläuft sehr schnell und kann unter bestimmten Umständen mit äquimolaren Mengen an Sulfonat zu einer vollständigen Reaktion führen. Das einfachste Alkyl-alkanthiosulfonat ist das Methyl-methanthiosulfonat (Methanthiosulfonsäure-S-methylester, MMTS). Durch Verwendung dieses Reagenzes können SCH₃-Gruppen ins Protein eingeführt werden. Zur Modifikation wurde das denaturierte Fusionsprotein nach frischer Reduktion 20 h bei Raumtemperatur bzw. 1 h auf Eis mit MMTS inkubiert. Im Anschluss wurde die Rückfaltung durch langsames Zutropfen des Rückfaltungspuffers bei 7.4 ohne TCEP initiiert, allerdings konnte bereits eine starke Aggregation des Ansatzes bei einer GdmCl-Konzentration von etwa 3 M beobachtet werden.

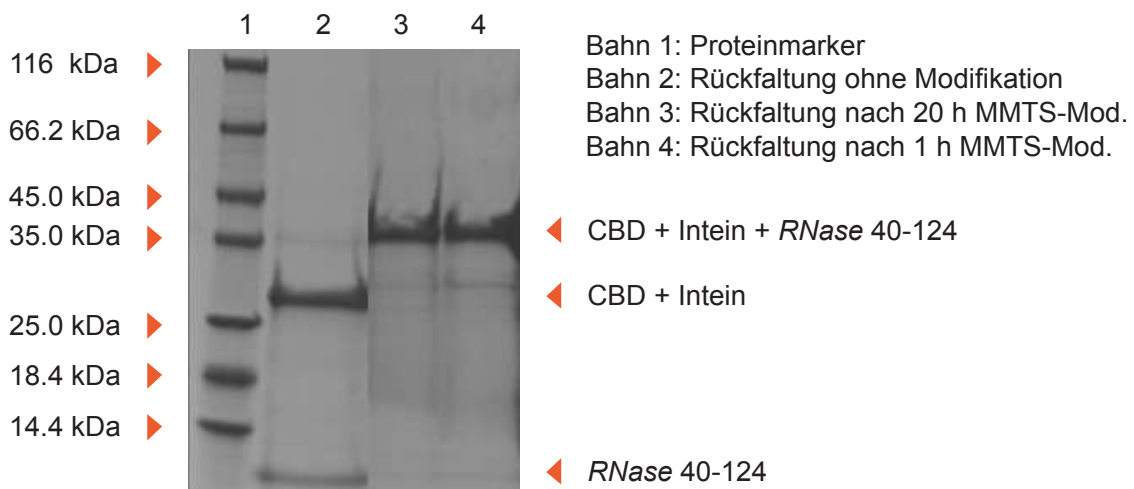


Abbildung 22. Rückfaltung nach Modifikation mit MMTS

Die Analyse mittels SDS-PAGE nach Verdünnung bis auf 0.1 M GdmCl und 2-tägiger Spaltung bei pH= 6.9 zeigte ein komplett ungespaltenes Fusionsprotein, was auf dessen vollständige Aggregation während der Rückfaltung zurückzuführen war. Da es sich bei der SCH₃-Gruppe um eine unpolare Gruppe handelt, wurde das gesamte Fusionsprotein durch Einführung von neun solchen Gruppen vermutlich zu hydrophob, wodurch es bei der Rückfaltung zu einer Aggregation unterhalb einer bestimmten GdmCl-Konzentration kam. Als alternatives Alkyl-alkanthiosulfonat wurde deshalb das kommerziell erhältliche 2-Carboxyethyl-methanthiosulfonat verwendet. Dieses erzeugt das gleiche gemischte Disulfid, das mit der 3,3'-Dithiodipropionsäure gewonnen werden kann, allerdings sollte die Reaktion schneller und quantitativ verlaufen. Das gelöste Fusionsprotein wurde dazu reduziert und über Nacht mit 2-Carboxyethyl-methanthiosulfonat bei einem pH-Wert von 8.5 unter Argon inkubiert. Die Rückfaltung wurde wie beschrieben bei pH = 7.4 durchgeführt (vgl. 4.2.1.7) und die Spaltung mittels SDS-PAGE analysiert.

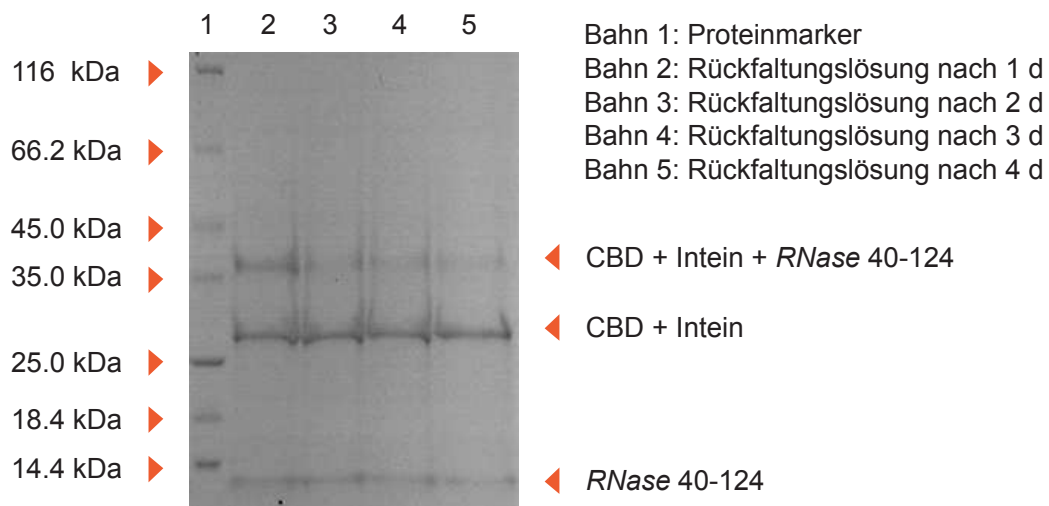


Abbildung 23. Rückfaltung nach Modifikation mit CEMTS

Es zeigte sich, dass die Spaltungseffizienz mit steigender Reaktionsdauer zunahm, was auf eine in diesem Falle positive Beeinflussung der Inteinspaltung durch die Nachbar-aminosäure hindeutete. Die Spaltung war bei den unmodifizierten IBs bereits nach einem Tag maximal (vgl. Abbildung 16), allerdings konnte auch nach 4 d Inkubationszeit bei dem modifizierten Fusionsprotein eine Spaltung von etwa 80-90 % beobachtet werden.

Inwiefern schon die Rückfaltung des Fusionsproteins durch die Modifikation der Cysteine beeinflusst wird, sollte durch eine alternative Strategie zur Bildung von gemischten Disulfiden mit 2-Carboxyethyl-methanthiosulfonat untersucht werden (Abbildung 24).

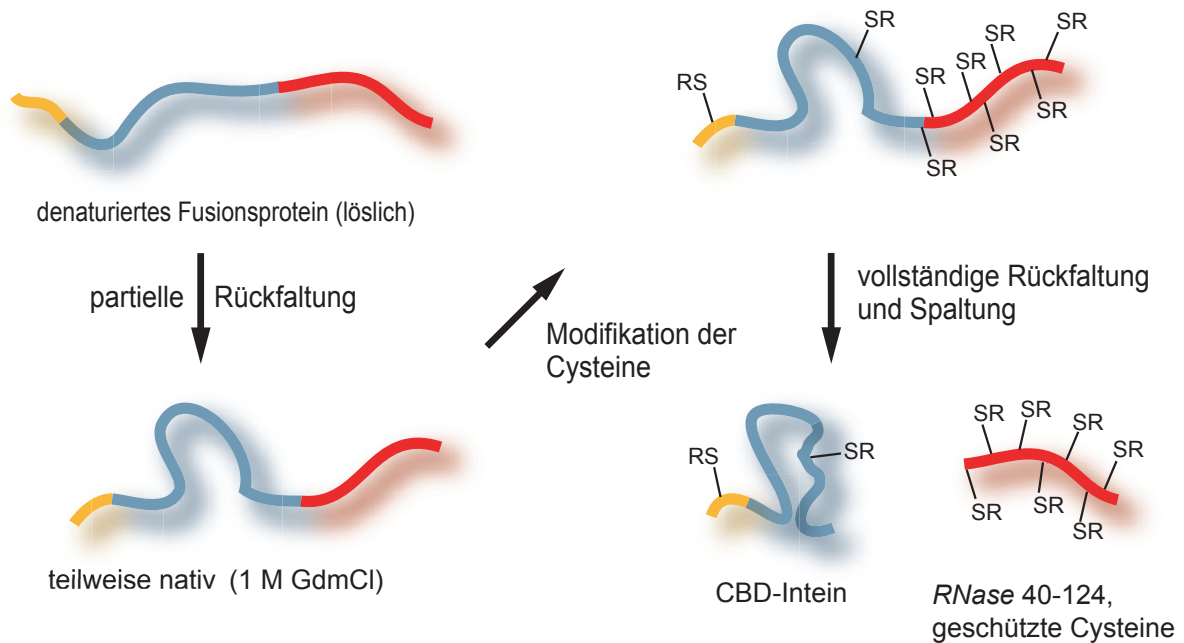


Abbildung 24. Alternative Strategie zur Gewinnung von RNase 40-124 mit geschützten Cysteinen

Dazu wurde das unmodifizierte Fusionsprotein zunächst unter reduzierenden Bedingungen (TCEP) bis auf eine Konzentration von 1 M GdmCl verdünnt. Dadurch sollte zunächst eine teilweise native Struktur des Inteins erzeugt werden. Nach 20 min wurde das Modifizierungsreagenz 2-Carboxyethyl-methanthiosulfonat zugegeben und ein pH-Wert von 8.5 eingestellt. Ein mögliches Problem ist die begrenzte Zugänglichkeit von Cysteinen bei einer Konzentration von 1 M GdmCl, da nur exponierte Gruppen an der Oberfläche für die Reaktion zur Verfügung stehen. Bereits im Inneren einer kompakten Proteinstruktur verborgene Cysteine könnten nicht modifiziert werden. Da das 2-Carboxyethyl-methanthiosulfonat stark sauer ist, musste es portionsweise zugegeben werden und sofort der pH-Wert mit 1 N NaOH alkalisch gehalten werden. Ein Absinken des pH-Wertes unter 7.0 könnte bereits zu einer unerwünschten Spaltung des Inteins führen. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden wurde die Lösung ohne Reduktionsmittel auf 0.1 M GdmCl verdünnt und nach drei Tagen bei einem pH-Wert von 6.9 die Spaltungseffizienz untersucht. Diese war identisch mit der Spaltung des direkt modifizierten Fusionsproteins (nicht gezeigt). Aufgrund des geringeren experimentellen Aufwandes wurde deshalb die Methode der direkten Modifikation bevorzugt.

5.1.5. Isolierung und Reinigung von *RNase* 40-124

Die in 5.1.4 gezeigten Ergebnisse der Rückfaltungs- bzw. Spaltungseffizienz gaben noch keine Auskunft über die Anzahl der modifizierten Cysteine im Fusionsprotein und im gewünschten Zielpeptid *RNase* 40-124. Dazu sollte das Zielfragment aus den Modifikationsmethoden mit GSSG, 3,3'-Dithiodipropionsäure und 2-Carboxyethyl-methanthiosulfonat isoliert und massenspektrometrisch charakterisiert werden. Da das Volumen durch die 60-fache Verdünnung bei der Rückfaltung stark vergrößert war, wurden die Lösungen zunächst mit Hilfe von Centriplus-Ultrafiltrationseinheiten konzentriert. Es wurden zunächst 10 ml-Einheiten verwendet, mit denen eine Volumenreduktion auf etwa 0.5 ml erreicht werden konnte. Zur weiteren Konzentration kamen 0.5 ml-Einheiten zum Einsatz, mit denen eine 5-fache Volumenreduktion möglich war. Beide Filtrationseinheiten enthielten eine Membran mit einem *cut off* von 3 kDa. Damit sollte sicher gestellt sein, dass das 9 kDa Zielpeptid *RNase* 40-124 im Überstand blieb und sich somit anreicherte. Um dies zu bestätigen, wurde zunächst der Durchbruch und der Überstand aus der Ultrafiltration mittels SDS-PAGE untersucht (Abbildung 25).

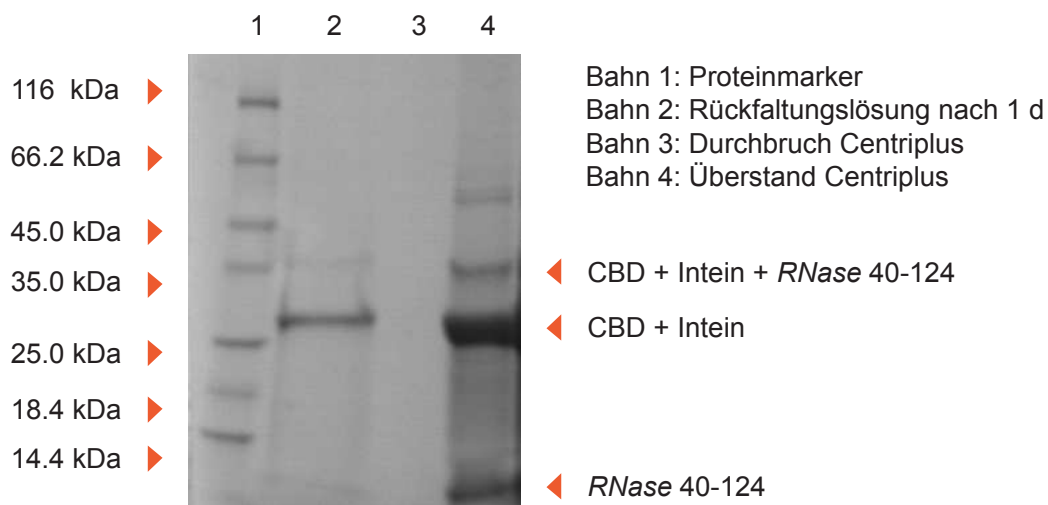


Abbildung 25. Durchbruch und Überstand der Ultrafiltration

Im Durchbruch war wie gewünscht kein Protein zu sehen, durch die Membran wurden also alle Peptide zurückgehalten. Zur Reinigung bzw. Isolierung wurde die konzentrierte Proteinlösung auf eine semipräparative C₈-Säule (XDB-C8 5 µm, 150 x 2.1 mm) gegeben. Durch einen linearen Gradienten von 10-50 % Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure konnte das Fragment *RNase* 40-124 erfolgreich von den beiden anderen Proteinen getrennt werden.

Abbildung 26 zeigt das HPLC-Profil der konzentrierten Rückfaltungslösung nach der Modifikation mit CEMTS. Die Chromatogramme der Rückfaltungen nach Modifikation mit GSSG bzw. DTDP zeigten ein analoges Profil.

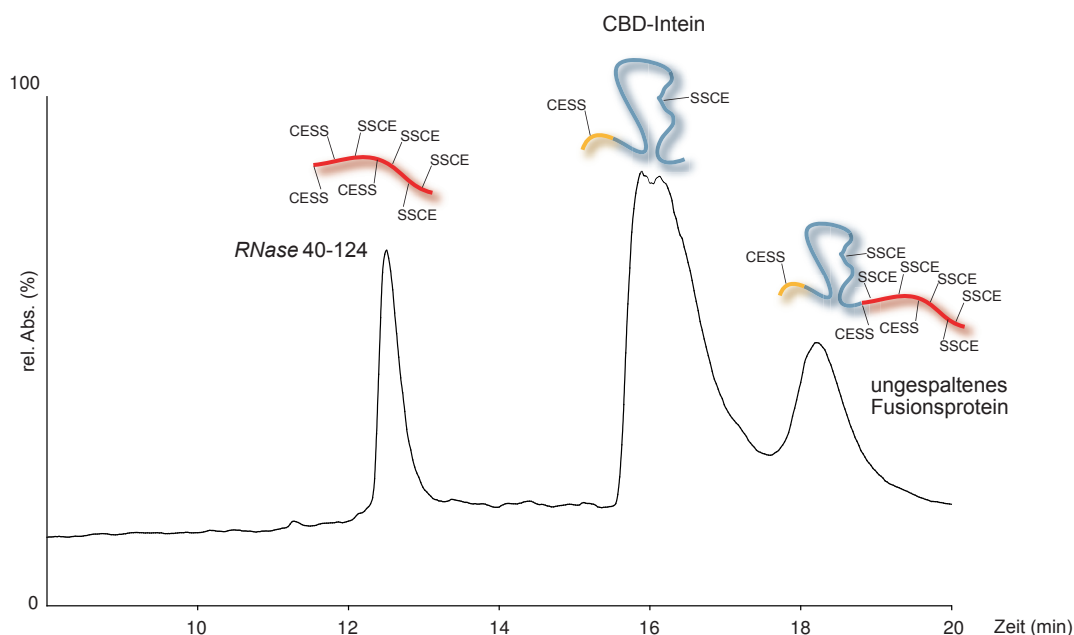


Abbildung 26. RP-HPLC Profil der konzentrierten Rückfaltungslösung nach Modifikation mit CEMTS

Die Untersuchung der gesammelten Fraktionen des Zielfragments *RNase* 40-124 durch LC-MS sollte Aufschluss über die Anzahl der Cysteinmodifikationen geben. In Form der gemischten Disulfide mit Glutathion konnte das Zielpeptid erstmals massenspektrometrisch nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 27).

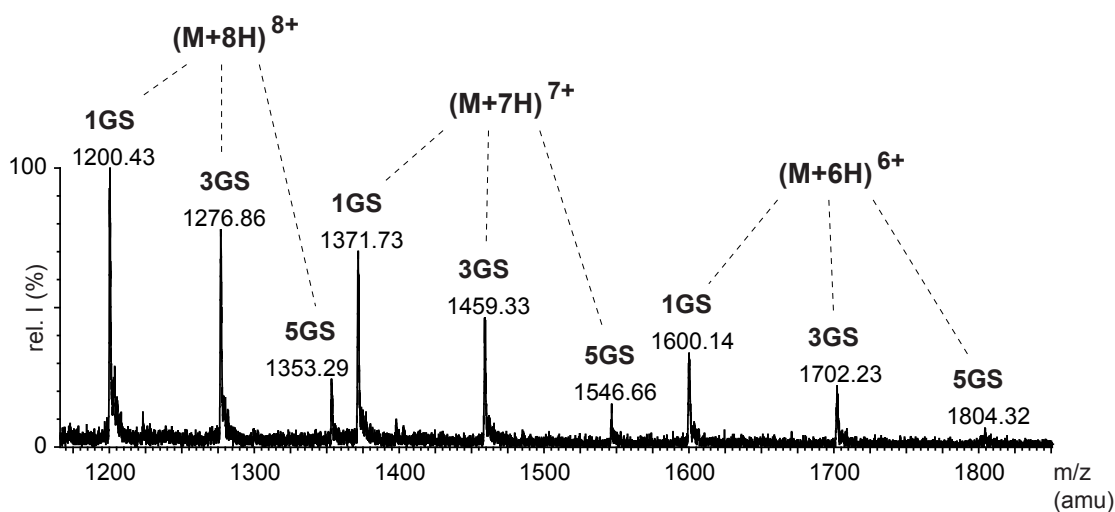


Abbildung 27. ESI-MS-Spektrum des Zielpeptids *RNase* 40-124 **1** mit GS-Schutzgruppen

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass nicht alle sieben Cysteine des Fragments *RNase* 40-124 als gemischtes Disulfid geschützt wurden. Im ESI-MS-Spektrum konnten Fragmente mit einer, drei oder fünf SG-Schutzgruppen detektiert werden. Ein Problem bei der Bildung gemischter Disulfide ist die gleichzeitige Ausbildung von Protein-Protein Disulfiden. Diese können durch Disulfidaustausch zwischen einem gemischten Disulfid und einem Thiol des Proteins entstehen. Der Prozess tritt auf, wenn bereits gemischte Disulfide ausgebildet wurden und gleichzeitig noch freie Thiole im Peptid vorhanden sind. Möglicherweise konnte daher kein Zielpeptid mit 2, 4 oder 6 Modifikationen beobachtet werden. Sobald eine gerade Anzahl an noch unmodifizierten Cysteinen im Protein vorliegt, kommt es entweder zur Modifikation beider Thiole oder es wird über zweifachen Disulfidaustausch ein Protein-Protein Disulfid gebildet. Da aus dem GSSG-Disulfid ein freies Thiol gebildet wird, ist auch eine Rückreaktion möglich, wodurch die gemischten Disulfide wieder gespalten werden können. Das Fehlen eines siebenfach geschützten Zielpeptids könnte auf eine Blockierung der Inteinspaltung im Falle einer Modifikation am benachbarten Cystein hindeuten.

Aus einem Milliliter *Inclusion Bodies* konnten mit dieser Methode 1.5 mg an geschütztem Peptid *RNase* 40-124 **1** erhalten werden, was einer Ausbeute von 2.1 mg pro Liter LB-Medium entspricht. Die Ausbeuteeinbußen sind vor allem durch eine unvollständige Inteinspaltung, Adsorption an die Membran und Aggregation während der Ultrafiltration sowie durch Verluste bei der HPLC-Reinigung zu erklären.

Ein ähnliches Ergebniss wurde im Fall des mit 3,3'-Dithiodipropionsäure modifizierten denaturierten Fusionsproteins erhalten. Im HPLC-Chromatogramm zeigte das Peptid einen leicht verbreiterten Peak.

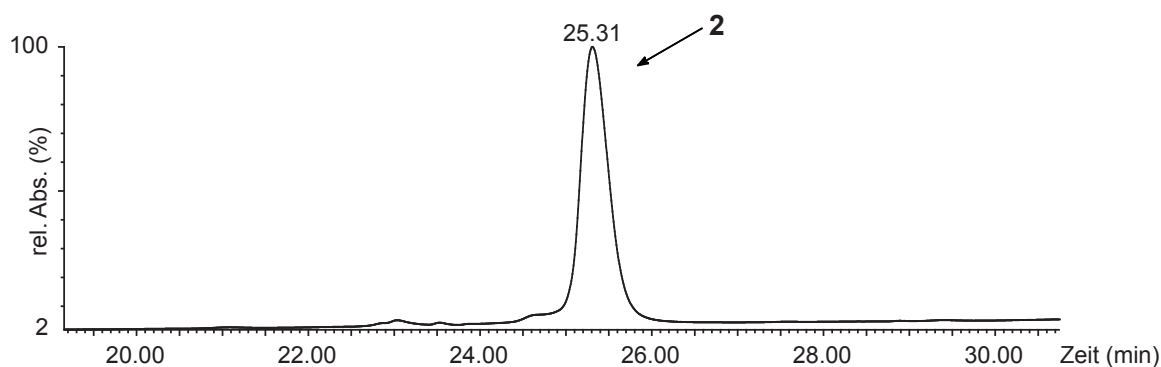


Abbildung 28. RP-HPLC Profil des isolierten Zielpeptids *RNase* 40-124 **2**

Auch hier konnte keine vollständige Bildung von sieben gemischten Disulfiden mit den Cysteinen des Fragments *RNase* 40-124 erreicht werden. Weiterhin konnte wie zuvor eine gerade Anzahl an Schutzgruppen (2, 4, 6) nicht beobachtet werden. Im Unterschied zur Modifikation mit GSSG war allerdings auch siebenfach geschütztes Zielpeptid nachzuweisen. Vergleicht man die Intensitäten im ESI-MS-Spektrum, kann man davon ausgehen, dass hauptsächlich 3-fach und 5-fach geschütztes Zielpeptid gewonnen werden konnte. Das Auftreten von siebenfach geschütztem Fragment *RNase* 40-124 zeigt, dass die Intein-spaltung auch bei einer Modifikation des benachbarten Cysteins möglich sein sollte.

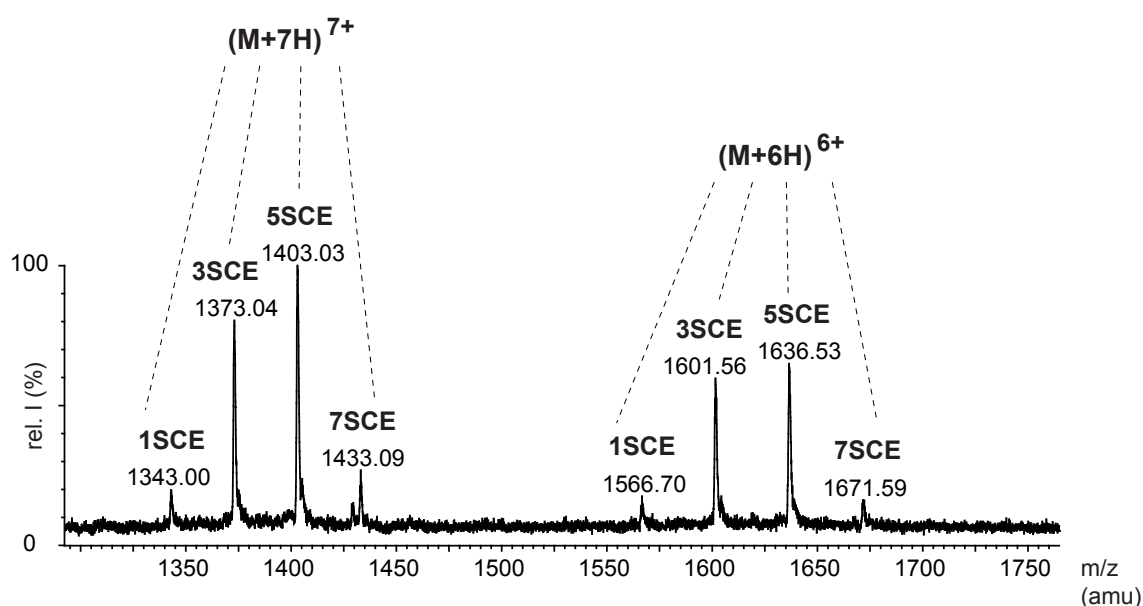


Abbildung 29. ESI-MS-Spektrum des Zielpeptids *RNase* 40-124 **2**

Im Falle der Modifikation des Fusionsproteins mit 3,3'-Dithiodipropionsäure konnten 2.8 mg geschütztes Peptid **2** pro Liter LB-Medium erhalten werden.

Die massenspektrometrische Charakterisierung des Produktes bei der Modifikation mit 2-Carboxyethyl-methanthiosulfonat lieferte ein von den anderen beiden Reagentien abweichendes Ergebnis. Die LC-MS-Analyse (Abbildung 30) zeigte nicht nur einen scharfen Peak des Zielpeptides, sondern konnte auch die vollständige Modifikation aller Cysteine im Fragment *RNase* 40-124 bestätigen. Durch die schnelle Reaktion mit dem Thiosulfonat wurden alle Thiole schnell und quantitativ über gemischte Disulfide geschützt, so dass ein Disulfidaustausch mit freien Thiolen im Protein nicht mehr möglich war. Außerdem ist im Falle von Thiosulfonaten das bei der Reaktion freigesetzte Produkt ein Sulfinat, so dass praktisch keine Rückreaktion stattfinden kann. Mit dieser Methode konnte also das mit der 2-Carboxyethylthiogruppe vollständig modifizierte Zielfragment *RNase* 40-124 **3** erhalten werden. Dieses ist nicht oxidationsempfindlich und kann im

trockenen Zustand mehrere Monate gelagert werden. Auch die Ausbeute war mit 3.5 mg gereinigtem Peptid **3** pro Liter LB-Medium im Vergleich zu den anderen Modifikationsmethoden (GSSG bzw. 3,3'-Dithiodipropionsäure) am höchsten.

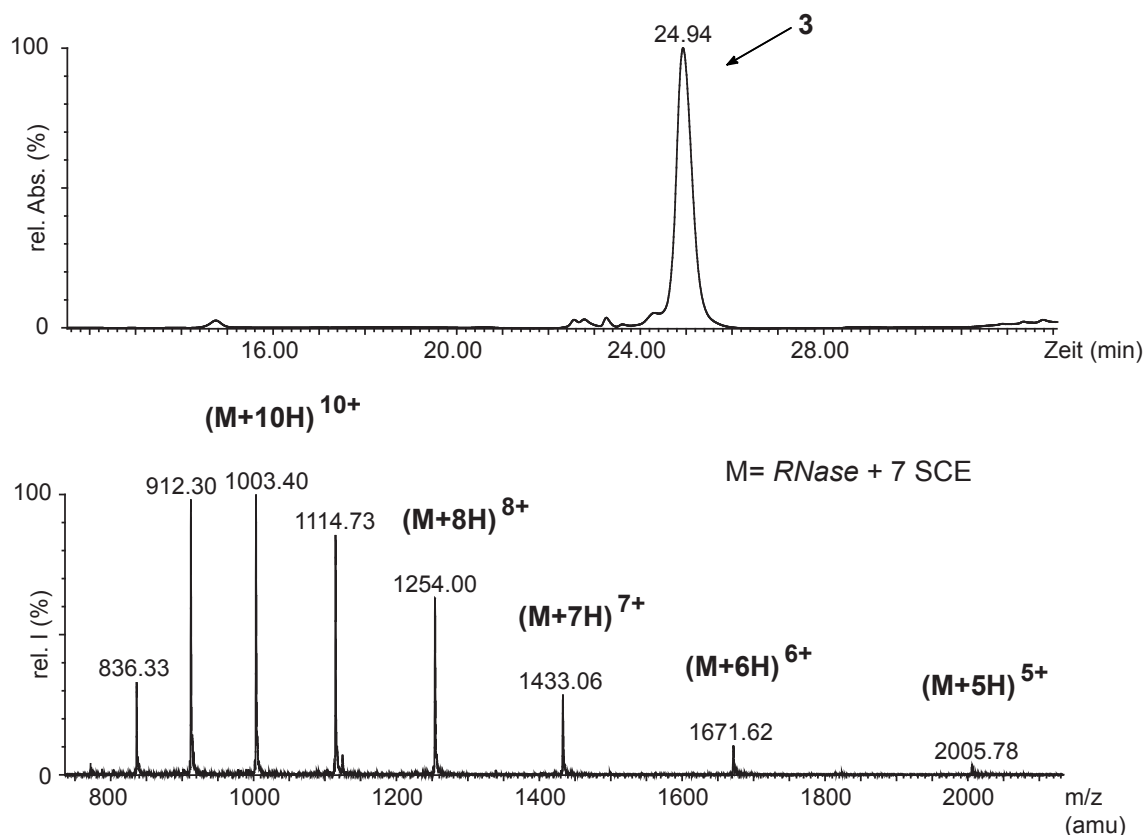


Abbildung 30. LC-MS-Analyse des isolierten Zielpeptids *RNase 40-124 3* (7 SCE)

Neben der LC-MS-Analyse wurde die Reinheit des Fragmentes mittels SDS-PAGE überprüft (vgl. Abbildung 31). Diese zeigte auf Bahn 2 ein reines Peptid *RNase 40-124 3* ohne Verunreinigung durch andere Proteine.

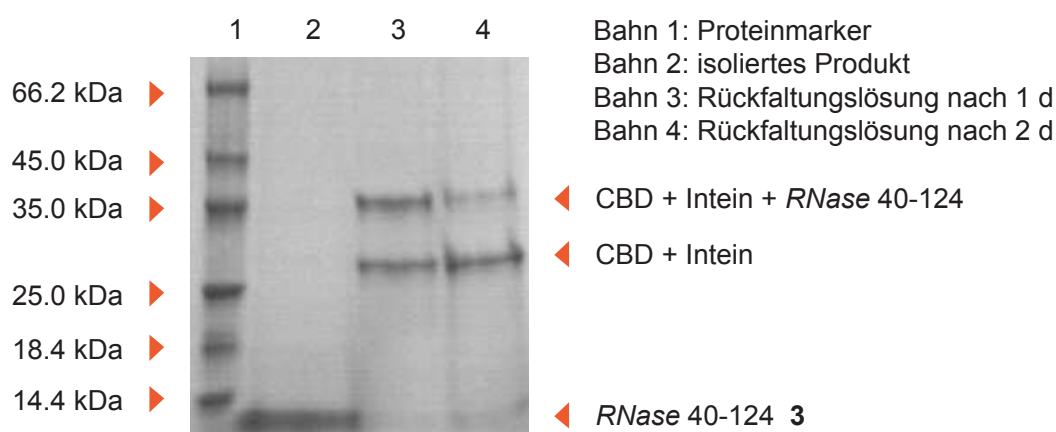


Abbildung 31. Isoliertes Peptid **3** (*RNase 40-124* + 7 SCE)

5.2. Synthese von Glycoproteinen durch native chemische Ligation

Nach der Gewinnung ausreichender Mengen des Bausteins *RNase* 40-124 **1** in stabiler Form sollten durch native chemische Ligation^[35] mit entsprechenden Thioestern verschiedene glycosylierte und nicht glycosylierte Varianten der bovinen *Ribonuclease* synthetisiert werden.

5.2.1. Synthese von Met-*RNase* 1-124

Um die Ligationfähigkeit des mit Glutathion modifizierten Fragments **1** zu bestätigen, wurde dieses zunächst mit dem molekularbiologisch gewonnenen Thioester Met-*RNase* 1-39 **4**^[137] ligiert. Dazu wurde ein Äquivalent **1** mit einem 3-fachen Überschuss an Thioester **4** in 6 M GdmCl bei einem pH von 7.5 gelöst und die Reaktion durch Zugabe von Thiophenol gestartet, was eine Absenkung des pH-Wertes auf ca. 7.0 zur Folge hatte (Abbildung 32).

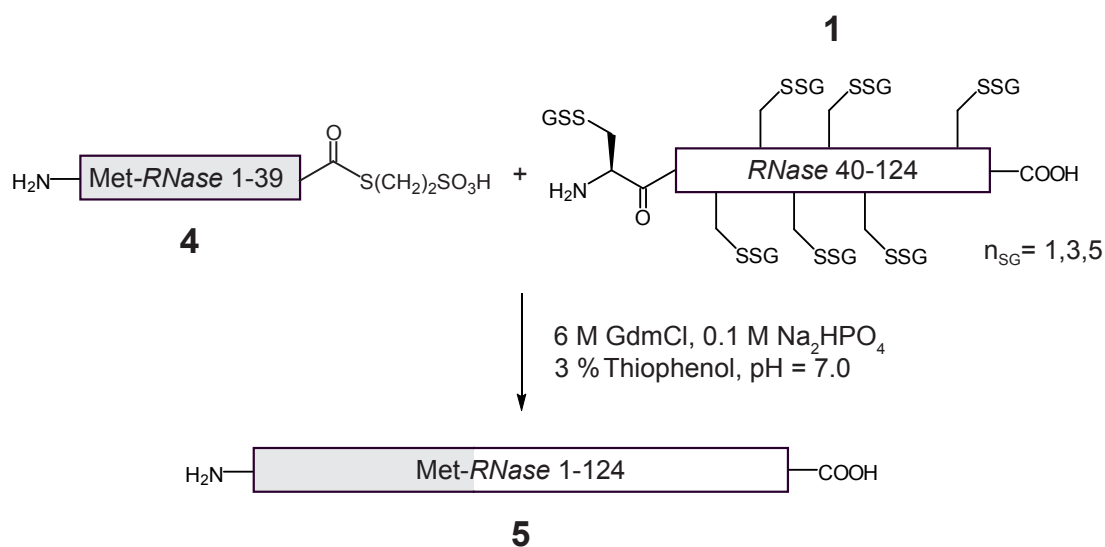


Abbildung 32. Ligation zu Met-*RNase* 1-124 **5**

Durch das zugesetzte Thiophenol bildete sich durch Thiolaustausch der reaktivere Phenylthioester **4a**.^[138] Außerdem sollten alle gemischten Disulfide von **1** reduziert werden. Nach 5 Minuten zeigte sich in der Lösung eine leichte Trübung, die bis Reaktionsende nicht mehr verschwand. Die Reaktion wurde nach 2 Tagen zunächst mittels SDS-PAGE kontrolliert (Abbildung 32). Diese zeigt eine Bande im erwarteten Bereich von 13.8 kDa, wobei der im Überschuss eingesetzte Thioester ebenfalls zu erkennen war. Als Referenz wurde kommerzielle *RNase* A verwendet, da diese fast das gleiche Laufverhalten besitzt.

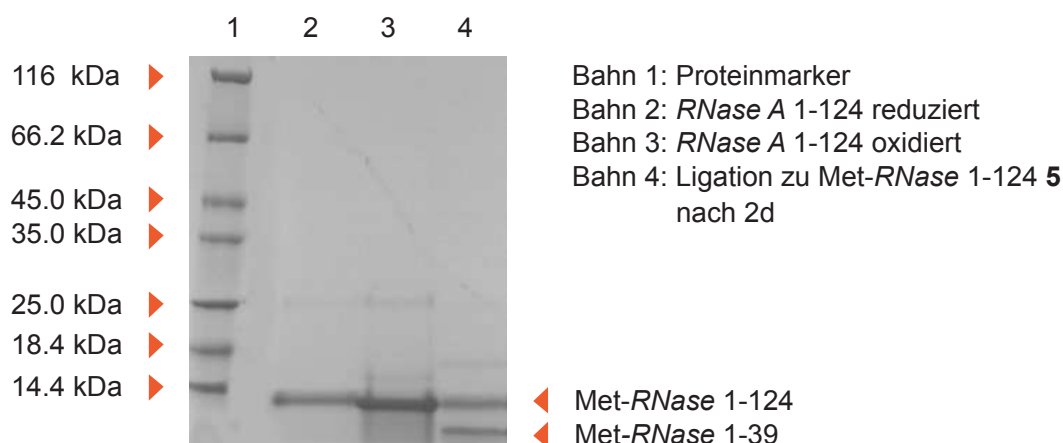


Abbildung 33. SDS-PAGE der Ligation zu Met-*RNase* 1-124 **5**

Neben der Reaktionskontrolle durch Gelelektrophorese konnte der Erfolg der Reaktion auch mittels LC-MS-Analyse bestätigt werden. Bei direkter Messung aus der Reaktionsmischung nach zwei Tagen konnte das Ligationsprodukt **5** in einem breiten Peak aus Disulfidisomeren detektiert werden. Durch Zugabe eines Überschusses des Reduktionsmittels Dithiothreitol vor der LC-MS-Analyse konnten die oxidierten Formen der Met-*RNase* 1-124 reduziert werden, was zu einem deutlich schärferen Peak im HPLC-Chromatogramm führte (Abbildung 34).

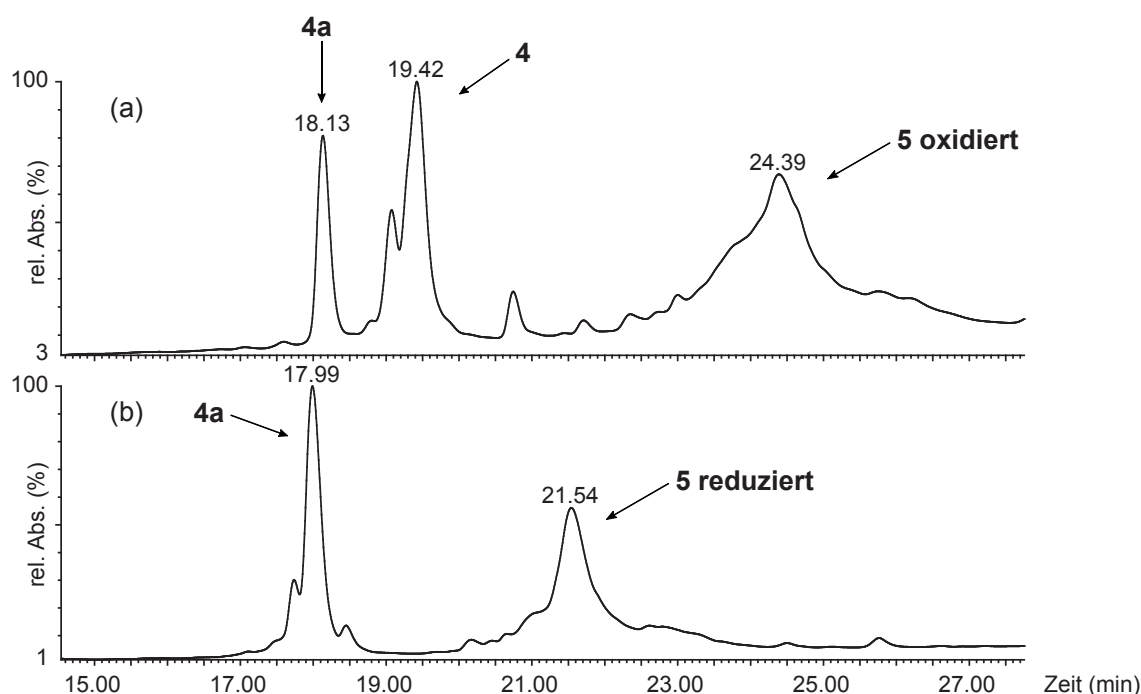


Abbildung 34. Analytisches HPLC-Profil der Ligation zu Met-*RNase* 1-124 **5**
(a) Ligrationslösung nach 2 d, (b) Ligrationslösung nach 2 d und 15 min DTT-Reduktion

Das ESI-MS-Spektrum zeigte die mehrfach geladenen Kationen des Ligationsproduktes Met-*RNase* 1-124 **5** und konnte das erwartete Molekulargewicht von 13.8 kDa bestätigen.

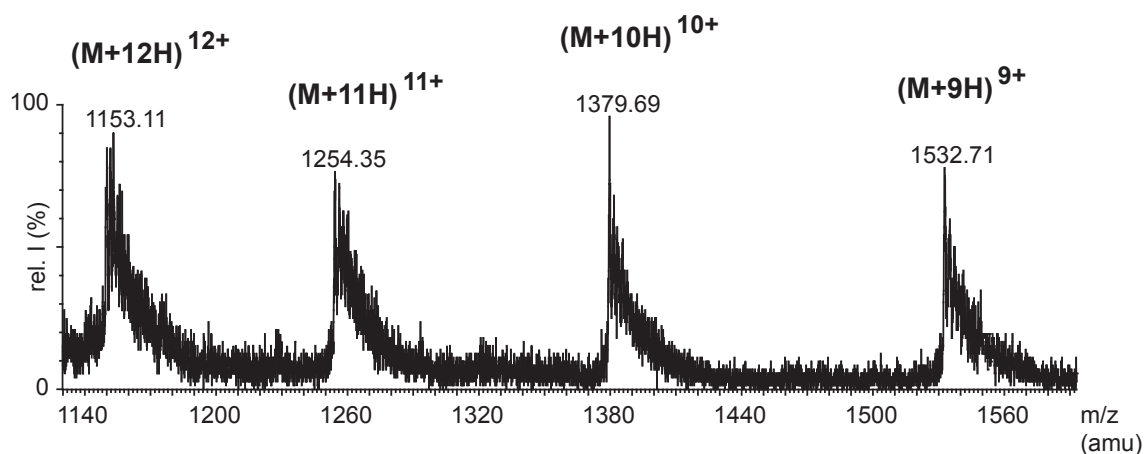


Abbildung 35. ESI-MS-Spektrum von Met-*RNase* 1-124 **5**

5.2.2. Synthese von *RNase* 1-124, Asn34(Ac₃GlcNAc)

Die für die Synthese von **5** eingesetzten Ligationsbedingungen wurden auf die Synthese einer *RNase* mit einem acetatgeschützten GlcNAc am Asparagin 34 übertragen. 1.5 Äquivalente des entsprechenden Thioesters **6**, der durch Festphasensynthese gewonnen wurde,^[139] wurden in 6 M GdmCl-Puffer mit einem Äquivalent **1** gelöst. Die Reaktion wurde mit Thiophenol gestartet und 2 Tage bei Raumtemperatur belassen (Abbildung 36).

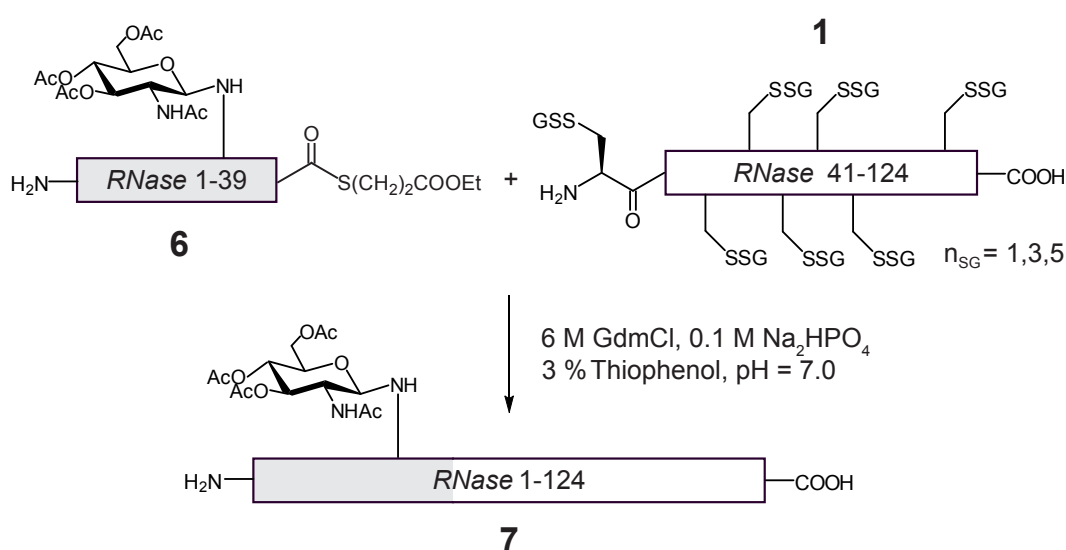


Abbildung 36. Ligation zu *RNase* 1-124, Asn34(Ac₃GlcNAc) **7**

Nach zwei Tagen zeigte die SDS-PAGE eine Produktbande im gleichen Bereich der als Referenz verwendeten *RNase A* (Molekulargewicht von 13.6 kDa, Abbildung 37).

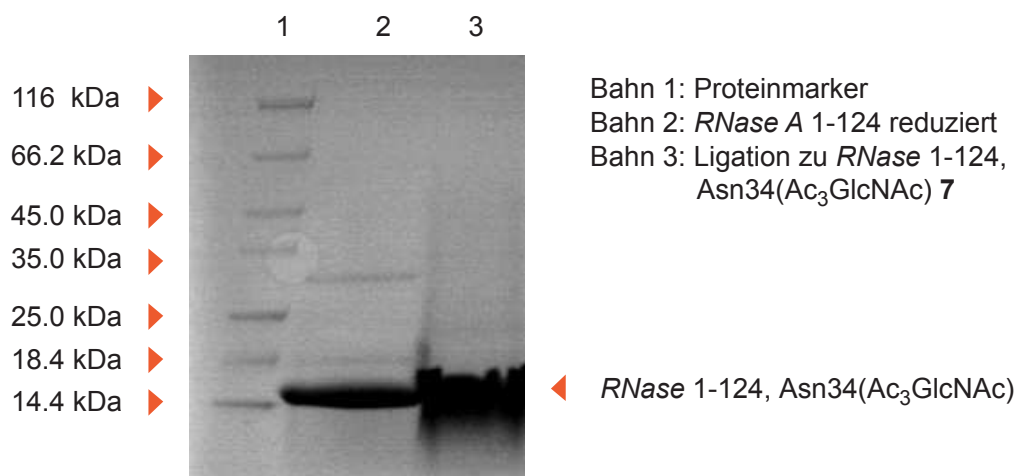


Abbildung 37. SDS-PAGE der Ligation zu *RNase* 1-124, Asn34(Ac₃GlcNAc) **7**

5.2.3. Synthese von *RNase* 30-124, Asn34Hepta

Mit Hilfe des glycosylierten Thioesters 30-39 **8** sollte zunächst der Einfluss eines acetylierten, komplexen N-Glycans auf die Ligrationsreaktion untersucht werden.

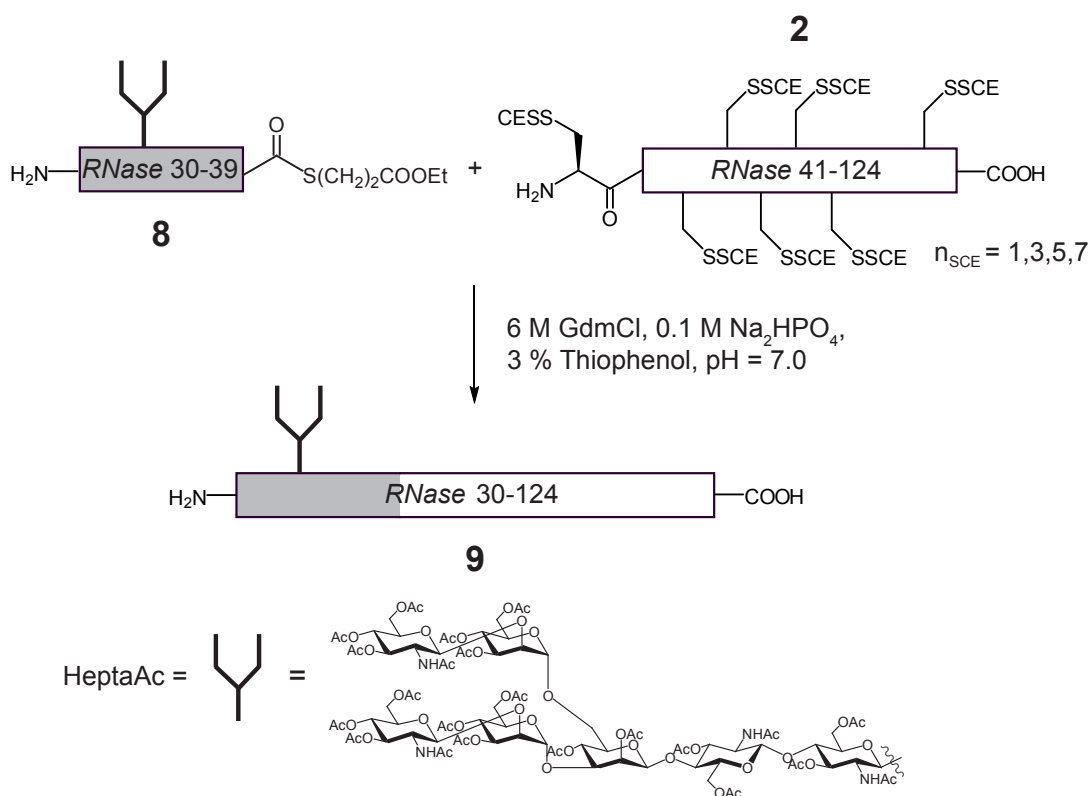


Abbildung 38. Ligation zu *RNase* 30-124, Asn34HeptaAc **9**

Dazu wurde das SCE-geschützte Fragment **2**, das aus einer Mischung von 1-, 3-, 5- und 7-fach modifizierten Cysteinen bestand, mit dem festphasenchemisch gewonnenen Glycopeptidthioester **8**^[140] in 6 M GdmCl unter Zugabe von Thiophenol ligiert (Abbildung 38). Nach kurzer Zeit waren eine starke Trübung und eine Aggregation in der Lösung zu beobachten. Das Fortschreiten der Ligation wurde nach 2 Tagen mittels LC-MS kontrolliert. Dazu wurden der Reaktion 5 µl entnommen und mit einem Überschuss DTT versetzt, bis die Lösung klar wurde. Im HPLC-Profil konnte der Peak bei 18.62 min als Ligationsprodukt **9** identifiziert werden. Bei 17.72 min eluierte der im Überschuss eingesetzte Thioester, der zum Phenylthioester **8a** umgeestert war. Das Fragment *RNase* 40-124 konnte nicht nachgewiesen werden, ebenso nur Spuren des hydrolysierten Thioesters **8**. Das ESI-MS-Spektrum bestätigte das erwartete Molekulargewicht, wobei mehrfach geladene Wasserstoffadukte gefunden wurden (Abbildung 40).

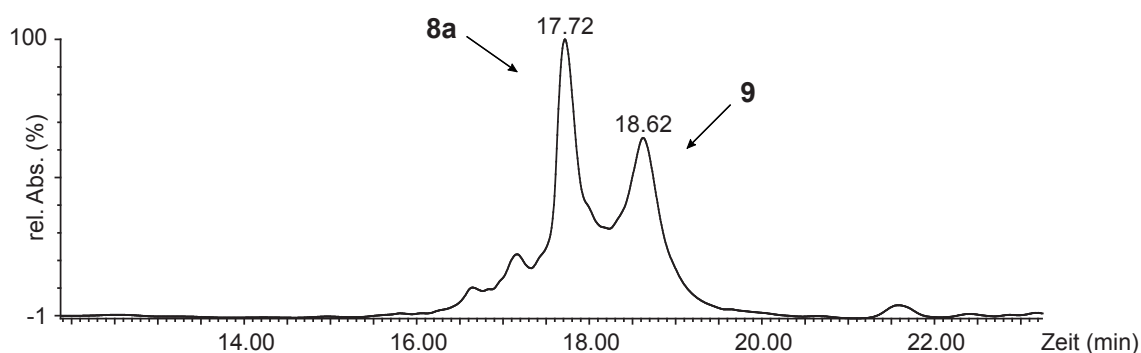


Abbildung 39. HPLC-Profil der Ligation zu *RNase* 30-124, Asn34HeptaAc **9**

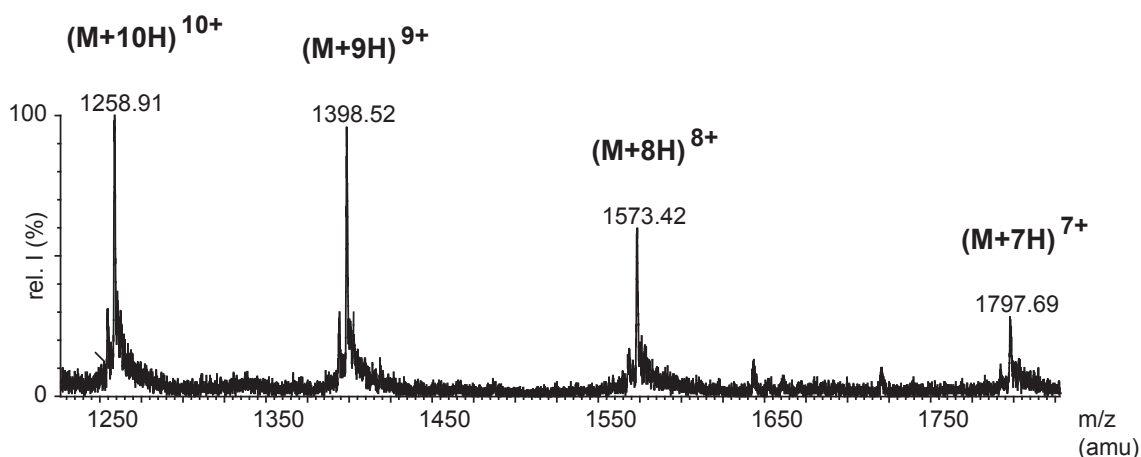


Abbildung 40. ESI-MS-Spektrum von *RNase* 30-124, Asn34HeptaAc **9**

Da bei der Festphasensynthese freie OH-Gruppen im Oligosaccharidteil zu unerwünschten Nebenreaktionen führen können, waren die Hydroxylgruppen des Heptasaccharids im Thioester **8** als Acetate geschützt. Die Gewinnung nativer Glycopeptide aus diesem Baustein erfordert abschließend eine Entschützung des peracetylierten Zuckers. Für die Desacetylierung wurden nach zweitägiger Reaktion bei 25 °C die Acetate durch Zugabe von 10 % wässrigem Hydrazinhydrat mit DTT direkt zur Ligationsmischung abgespalten (Abbildung 41). Bei der Reaktion mit Hydrazinhydrat ist die Reaktionszeit sehr genau zu beachten. Bei einer längeren Inkubationszeit kann es durch Hydrazinolyse zur Spaltung von Peptidbindungen kommen, was eine Zerstörung des Ligationsproduktes zur Folge hätte. Deshalb wurde die Reaktion bereits nach einer Stunde mittels LC-MS untersucht.

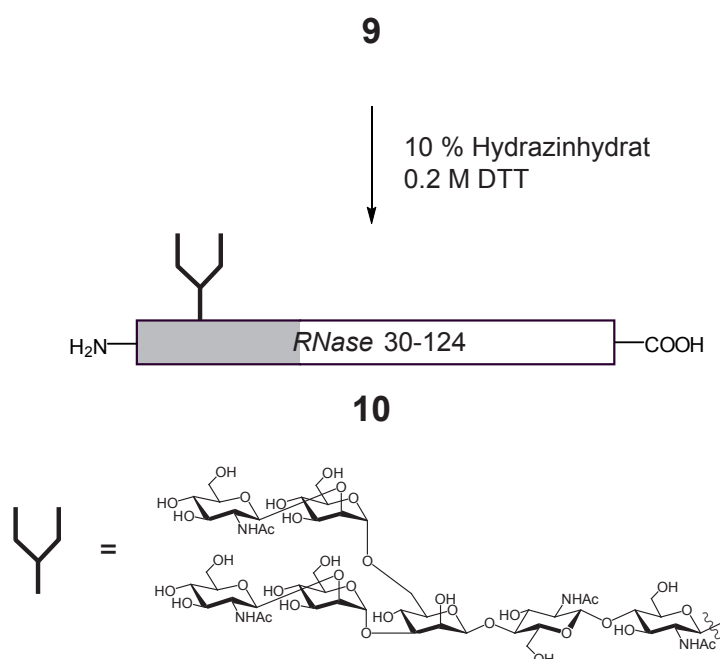


Abbildung 41. Acetatabspaltung zu RNase 30-124, Asn34Hepta **10**

Das RP-HPLC-Chromatogramm zeigte als Hauptpeak bei 21.50 min das gewünschte Produkt **10** ohne Acetatschutzgruppen. Da mit einer Acetonitrilkonzentration von 20 % begonnen wurde, konnte der im Überschuss eingesetzte Thioester **8** abgetrennt werden. Durch ESI-MS konnte das Molekulargewicht von 11.8 kDa bestätigt werden. Dargestellt sind die Peaks der 9- und 10-fach geladenen Wasserstoffaddukte bei 1325.68 und 1183.71 Da.

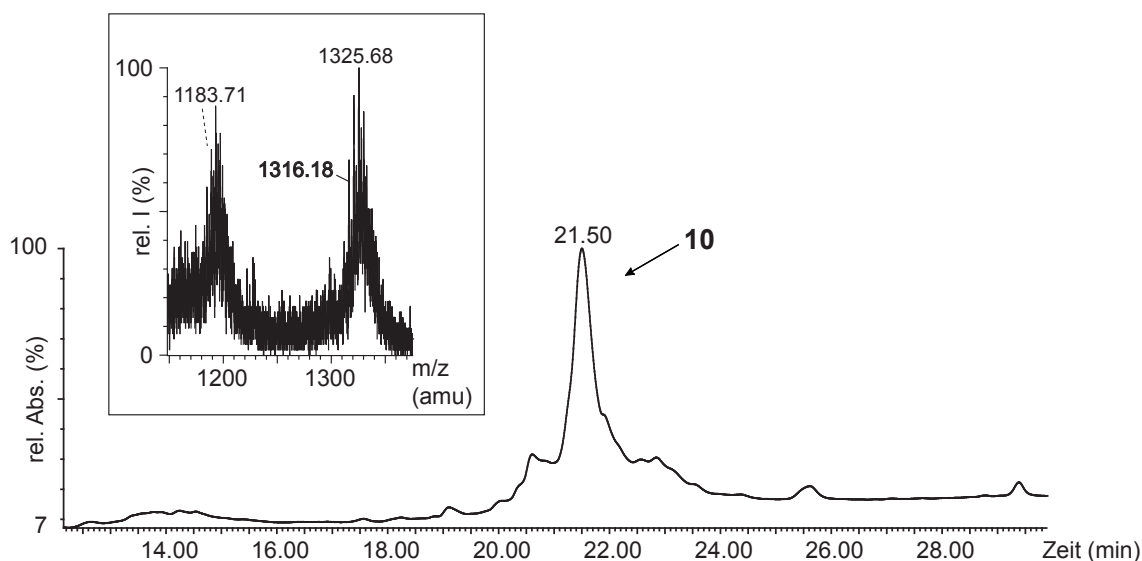


Abbildung 42. LC-MS-Analyse der Acetatabspaltung zu **10**

5.2.4. Synthese von *RNase* AcThz-26-124, Asn34Nona

Die Erkenntnisse der Umsetzung des Heptasacchariddecapeptids **8** sollten auf die Ligation mit einem Glycopeptidthioester, der ein Nonasaccharid enthält, angewandt werden. Dazu wurde der Thioester *RNase* 26-39 **11** verwendet,^[141] der zur sequentiellen Ligation synthetisiert wurde (vgl. Abbildung 13).

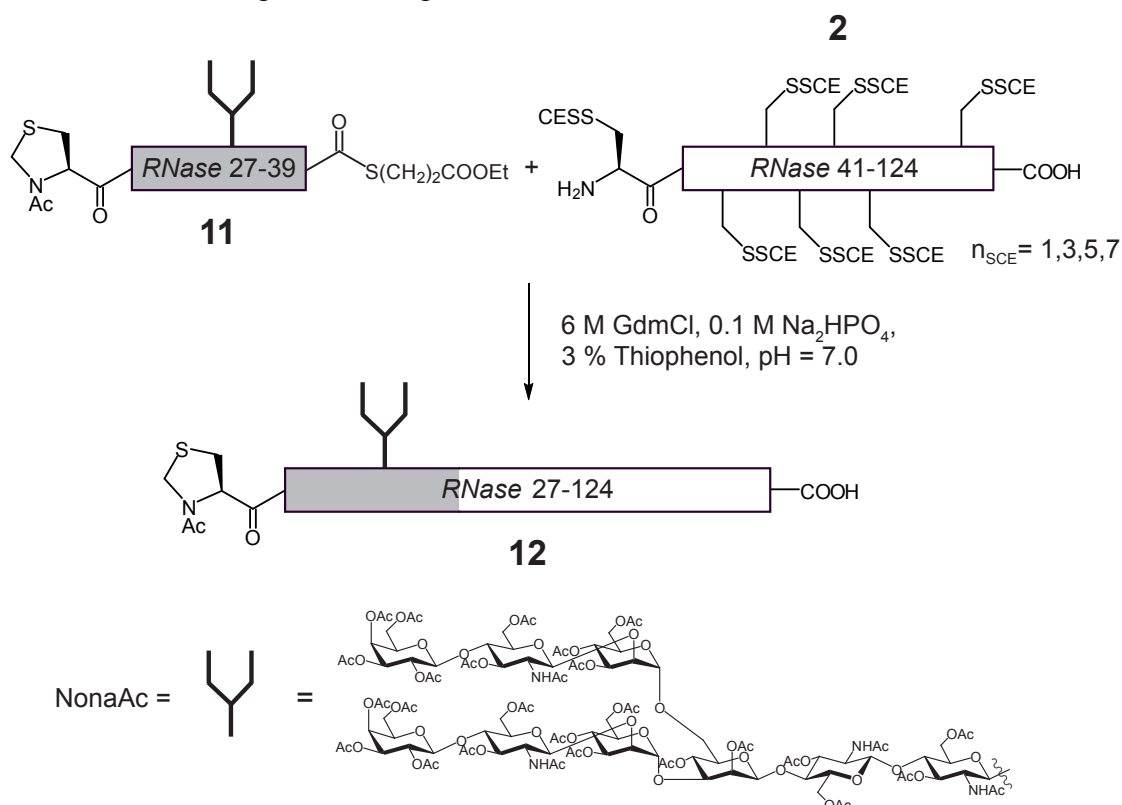


Abbildung 43. Ligation zu *RNase* AcThz-26-124, Asn34NonaAc **12**

Allerdings trug Verbindung **11** durch eine Nebenreaktion bei der Synthese nicht nur an den Hydroxylgruppen des Oligosaccharids Acetatschutzgruppen, sondern war auch am Stickstoff des Thiazolidinrestes acetyliert. Dies machte das Öffnen der Schutzgruppe unter Freisetzung des N-terminalen Cysteins des Ligationsproduktes 26-124 zwar nicht möglich, jedoch konnte **11** als gutes Modellsystem dienen. Um die Reaktivität zu überprüfen, wurden 1.2 Äquivalente Glycopeptidthioester **11** mit 1 Äquivalent Cysteinpeptid **2** in Gegenwart von 6 M GdmCl/0.1 M Na₂HPO₄-Puffer und Thiophenol als Aktivator bei einem pH-Wert von 7.0 ligiert.

In der Reaktionsmischung konnte erneut eine starke Trübung bzw. eine Aggregation beobachtet werden. Vor der LC-MS-Analyse musste deshalb mit Hilfe von DTT reduziert werden. Das gewünschte Ligationprodukt konnte nach zwei Tagen im Elutionsprofil bei 22.20 min detektiert und die korrekte Masse durch ESI-MS bestätigt werden. Der Peak bei 20.47 min entspricht dem umgeesterten Phenylthioester von **11**.

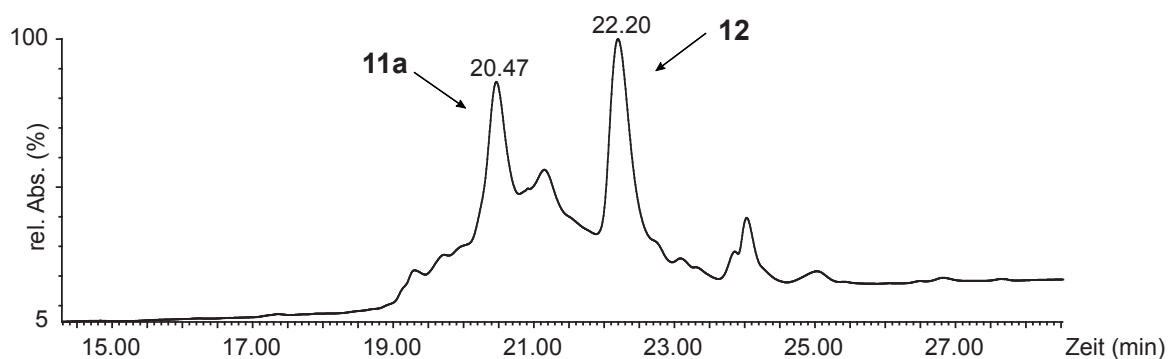


Abbildung 44. HPLC-Profil der Ligation zu RNase AcThz-26-124, Asn34NonaAc **12**

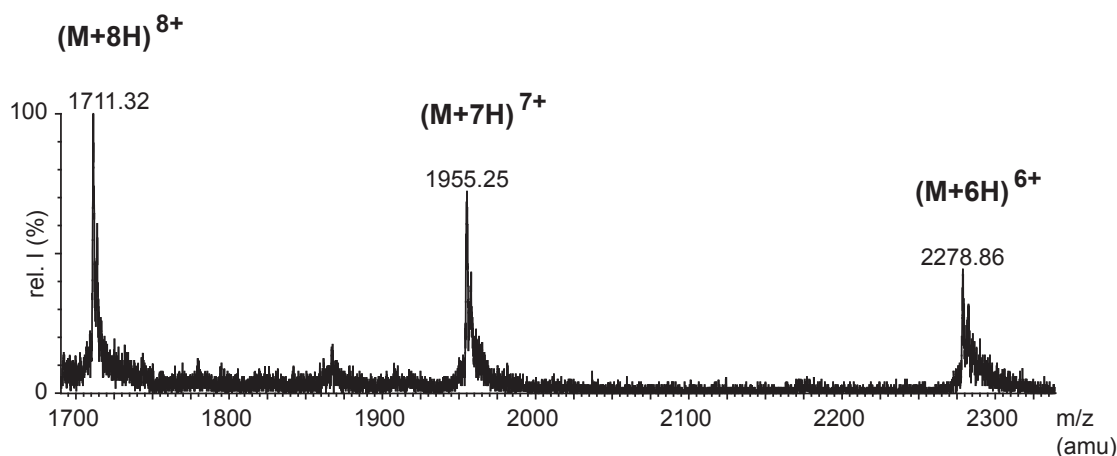


Abbildung 45. ESI-MS-Spektrum von RNase AcThz-26-124, Asn34NonaAc **12**

Die anschließende Abspaltung der Schutzgruppen des Oligosaccharidanteils zum entschützten Ligationsprodukt *RNase* AcThz-26-124 **13** sollte durch Zugabe von 10 % wässrigem Hydrazinhydrat erfolgen. Trotz Zugabe von DTT als Reduktionsmittel war ein Verschwinden der Trübung nicht zu beobachten. Durch LC-MS-Analyse konnte die Umsetzung zu **13** nicht bestätigt werden. Es wurde eine irreversible Oxidation bzw. Aggregation des entschützten Produktes vermutet.

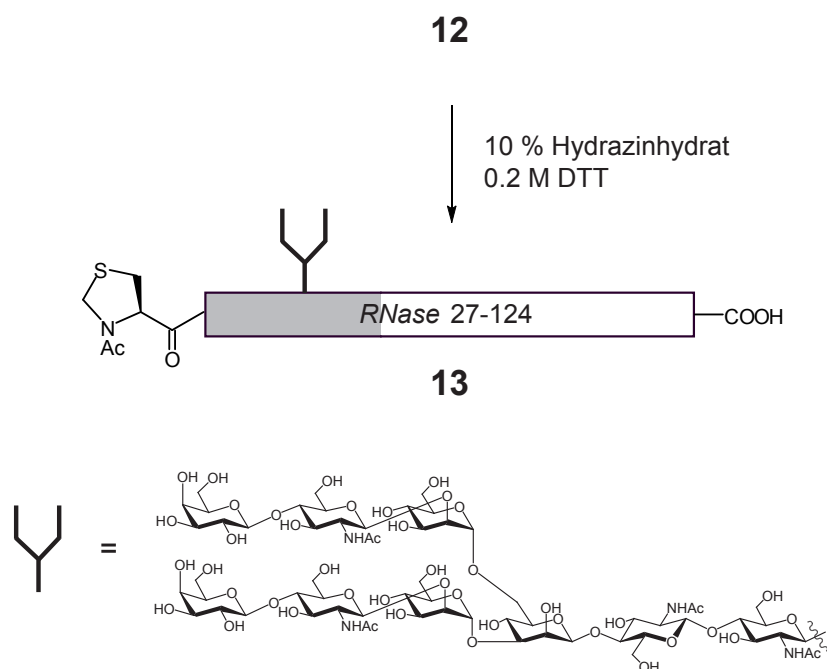


Abbildung 46. Acetatabspaltung zu *RNase* AcThz-26-124, Asn34Nona **13**

5.2.5. Optimierte Synthese von Met-*RNase* 1-124

Auf Grund der auftretenden Schwierigkeiten bei der Ligation (Aggregation, Oxidation) mussten die Ligationsbedingungen optimiert werden. Die vermutlich durch Oxidation ausgelöste Aggregation zeigte sich als größtes Problem, v.a. bei der Analytik der Reaktionen. Das symmetrische Disulfid des Thiophenols, das sich langsam während der Ligation bildet, neigt selbst zur Aggregation und kann auch für Copräzipitationen von Edukten oder Produkten sorgen.^[142] Daher sollte der Ligation ein alternatives Thiol als Aktivator bzw. Reduktionsmittel zugesetzt werden. Wegen der guten Eigenschaften bei der Reduktion vor der LC-MS-Analyse wurde deshalb zunächst DTT ausgewählt. Trotz einer klar bleibenden Lösung konnte allerdings keine Ligation beobachtet werden. Zwar konnte durch ESI-MS eine Umesterung des Thioesters zum entsprechenden DTT-Derivat nachgewiesen werden (nicht gezeigt), allerdings kann dieser Thioester auf Grund der

benachbarten OH-Gruppe sich in einen für die native chemische Ligation unreaktiven Oxoester umwandeln. Daher wurde stattdessen zur Ligationsmischung als Reduktionsmittel TCEP zugegeben.^[143] Dieses sollte sowohl die Oxidation von Thiophenol, als auch die Bildung von Disulfiden verhindern. Zusätzlich wurde der Chelatbildner EDTA verwendet, um die metallkatalysierte Oxidation von Cysteinen durch Luftsauerstoff zu verhindern. Als weitere Modifikation des Ligrationsprotokolls wurden von diesem Zeitpunkt an alle Ligationen in einem anaeroben Zelt ausgeführt, um eine Einwirkung von Sauerstoff auf die Reaktion auszuschliessen. Die Reaktionen wurden außerhalb des Zeltes in einer Argonatmosphäre angesetzt, wobei ein mit Schraubdeckel verschliessbares Glasgefäß verwendet wurde, um die, bei einem aus Polypropylen bestehenden Eppendorfgefäß mögliche, Diffusion von Sauerstoff in den Reaktionsbehälter zu vermeiden. Diese Bedingungen wurden zunächst mit dem molekularbiologisch gewonnenen Thioester Met-*RNase* 1-39 **4** getestet. Außerdem stand zu diesem Zeitpunkt das vollständig disulfidmodifizierte Fragment *RNase* 40-124 **3** zur Verfügung. Beide Fragmente wurden in einem 6 M GdmCl-Ligationspuffer bei pH = 7.5 gelöst, der zusätzlich 30 mM TCEP und 2 mM EDTA enthält. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von Thiophenol, wodurch sich ein pH-Wert in der Lösung von 7.0 einstellte.

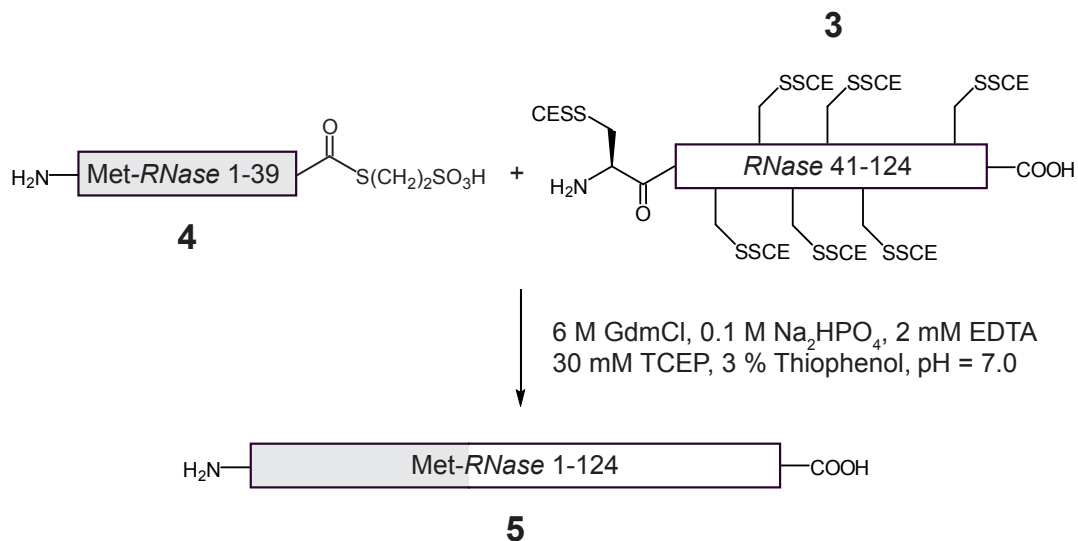


Abbildung 47. Optimierte Ligation zu Met-*RNase* 1-124 **5**

Die veränderte Reaktionsführung hatte zur Folge, dass die Ligationslösung auch nach zwei Tagen Inkubationszeit völlig klar blieb und keinerlei Aggregation beobachtet werden konnte. Im Anschluss wurde die Ligation mittels SDS-PAGE untersucht. Dabei zeigte sich auf Bahn 2 eine deutliche Bande im Bereich von 13.8 kDa, die das gleiche

Migrationsverhalten besaß, wie die als Referenz verwendete *RNase A* (Abbildung 48). Restliche *RNase* 40-124 konnte nicht mehr detektiert werden.

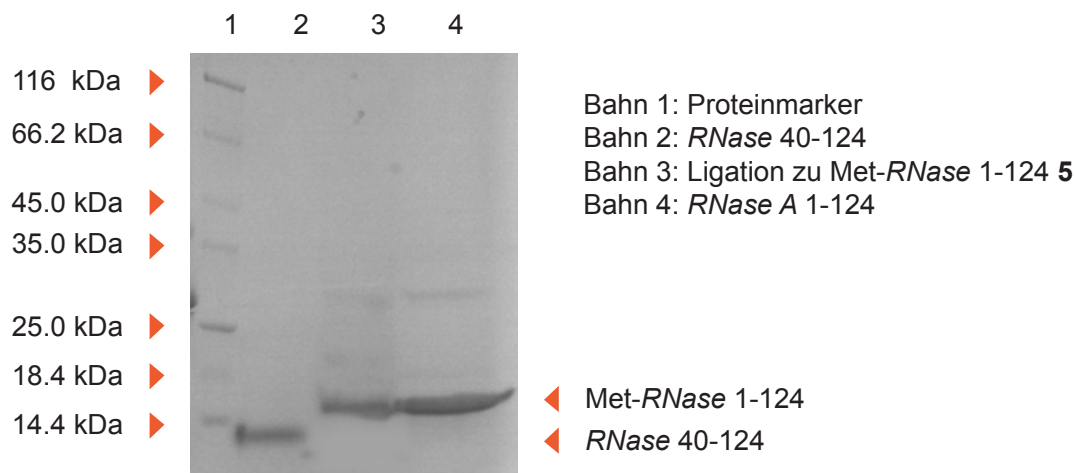


Abbildung 48. SDS-PAGE der optimierten Ligation zu Met-*RNase* 1-124 **5**

Nach der Bestätigung der Ligation durch LC-MS wurde das Produkt mit Hilfe einer Gelfiltrationschromatographie isoliert. Als Ausbeute konnten 36 % **5** erhalten werden. Die Reinheit des reduzierten Produktes Met-*RNase* 1-124 **5** wurde mittels LC-MS-Analyse überprüft und zeigte einen Hauptpeak bei einer Elutionszeit von 21.28 min mit einer kleinen Verunreinigung.

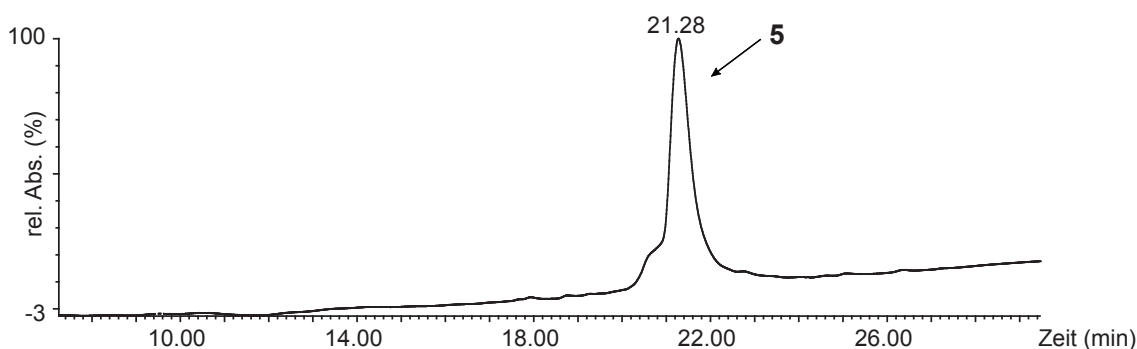


Abbildung 49. HPLC-Profil des gereinigten Ligationsproduktes **5**

Das korrespondierende ESI-MS-Spektrum des Hauptpeaks zeigte die erwartete Masse des Produktes von 13.8 kDa. Zu sehen sind die sieben- bis elffach geladenen Kationen von **5** (Abbildung 50).

Durch die Optimierung des Ligationsprotokolls in mehreren Punkten konnte neben den Reaktionen auch die Qualität der RP-HPLC-Chromatogramme und der ESI-MS-Spektren wesentlich verbessert werden.

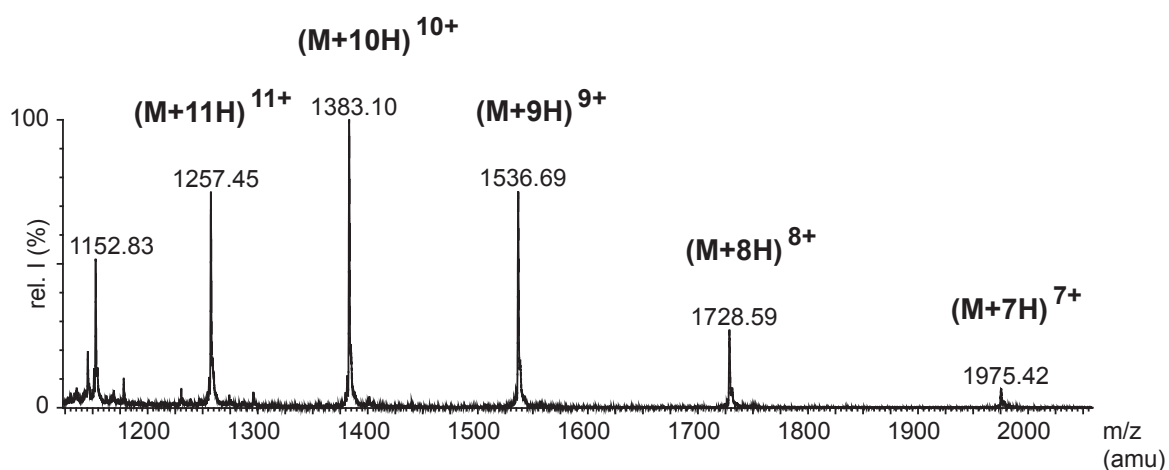


Abbildung 50. ESI-MS-Spektrum von Met-RNase 1-124 **5**

5.2.6. Synthese von Met-RNase 1-124, (SCE)₈

Um den Einfluss der freien Cysteine auf die Isolierung von **5** zu untersuchen, sollten diese im Ligationsprodukt Met-RNase 1-124 durch 2-Carboxyethyl-methanthiosulfonat zu gemischten Disulfiden umgesetzt werden.

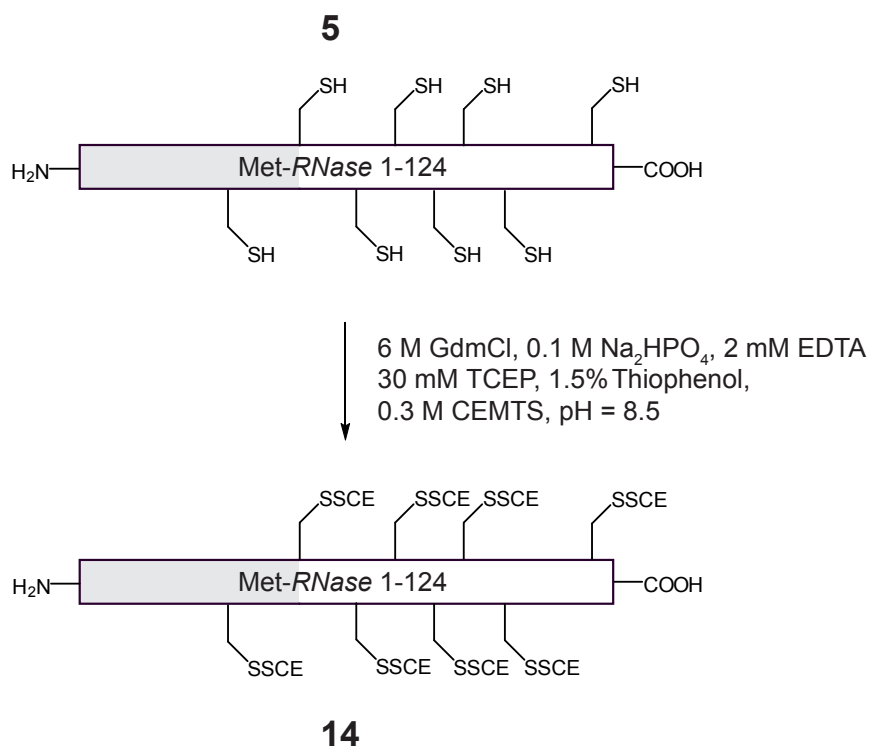


Abbildung 51. Synthese von Met-RNase 1-124, (SCE)₈ **14**

Dazu wurde nach erfolgter Ligation zu **5** die Mischung im gleichen Verhältnis mit Ligationspuffer ohne Thiophenol verdünnt, um die oxidierten Cysteine durch frisches TCEP zu reduzieren. Im Anschluss wurde ein Überschuss (0.3 M) an CEMTS zugegeben und der pH-Wert auf 8.5 eingestellt. Der Thiophenolgeruch verschwand sofort, was auf die Bildung des gemischten Thiophenyl-disulfides hindeutete. Nach 1 min Reaktionszeit zeigte sich durch LC-MS-Analyse bereits das 8-fach geschützte Produkt **14**.

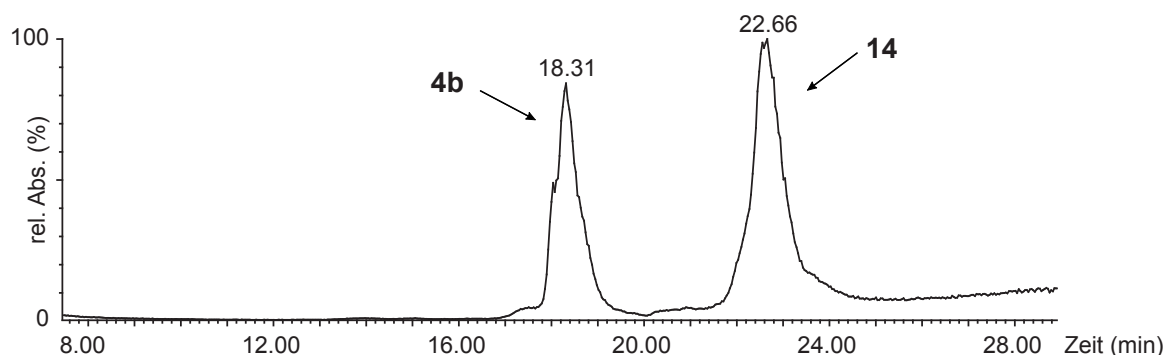


Abbildung 52. Analytisches HPLC-Profil der geschützten Met-RNase 1-124, (SCE)₈ **14**

Das ESI-MS-Spektrum zeigte eine Massenzunahme von 832 Da (8×104) zu einer Masse von 14655 Da. Es konnten die mehrfach geladenen Wasserstoffaddukte des modifizierten Ligationsproduktes **14** gefunden werden.

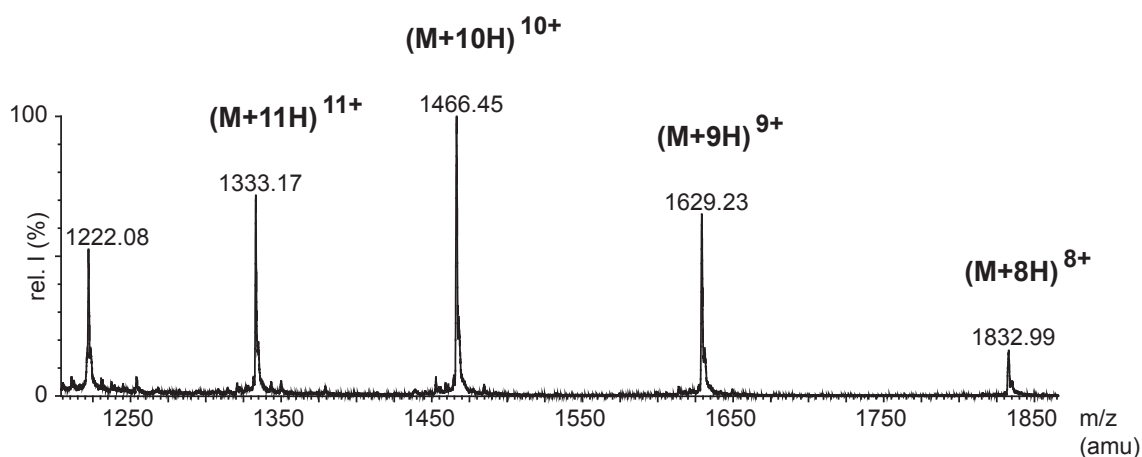


Abbildung 53. ESI-MS-Spektrum von Met-RNase 1-124, (SCE)₈ **14**

Das als Disulfid geschützte Produkt **14** wurde durch Gelfiltration gereinigt und konnte in einer Gesamtausbeute von 33 % erhalten werden. Im Anschluss wurde das isolierte Produkt rückgefaltet und ein Aktivitätstest durchgeführt (vgl. 5.3). Da die Modifikation der

Cysteine vor der Isolierung keine Ausbeuteverbesserungen brachte, wurden weitere Reinigungen von Ligationsprodukten durch Gelfiltration ohne diesen zusätzlichen Reaktionsschritt durchgeführt.

5.2.7. Synthese von *RNase* 1-124, Asn34Nona

Die Synthese der kompletten *RNase* 1-124 mit einem komplexen N-Glycan an Asn34 wurde mit Hilfe der optimierten Ligationsbedingungen unter Anwendung der sequentiellen Ligationsstrategie versucht (vgl. Abbildung 13). Für die erste Ligation wurde dazu das Fragment *RNase* 40-124 **3** mit dem Glycopeptidthioester **15** ligiert. Durch einen alternativen Weg in der Festphasensynthese konnte der Thioester **15** ohne Acetate an den Hydroxylgruppen des Oligosaccharids gewonnen werden.^[141] Dadurch konnte die zusätzliche Behandlung mit Hydrazinhydrat nach der Ligation zur Desacetylierung umgangen werden.

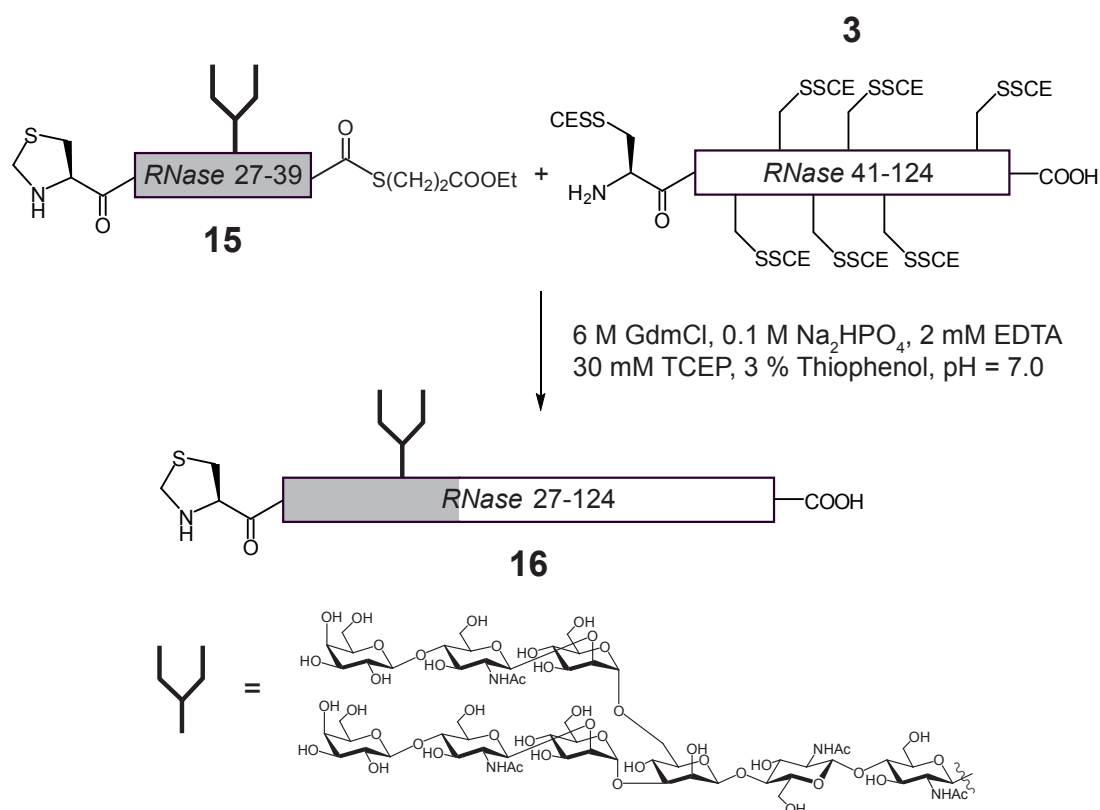


Abbildung 54. Ligation zu *RNase* Thz-26-124, Asn34Nona **16**

Fragment **3** und Thioester **15** wurden im optimierten GdmCl-Puffer mit TCEP und EDTA gelöst und zwei Tage unter Sauerstoffausschluss im anaeroben Zelt bei Raumtemperatur inkubiert. Das Fortschreiten der Ligation wurde mittels LC-MS-Analyse und SDS-PAGE

kontrolliert. Neben umgeestertem Thioester **15a** konnte ebenfalls in geringen Mengen das Verseifungsprodukt des Ethylesters detektiert werden. Dieses schien für eine Ligation, bzw. Umesterung nicht mehr zur Verfügung zu stehen, so dass ein besser geeigneter Thioester entwickelt werden sollten.

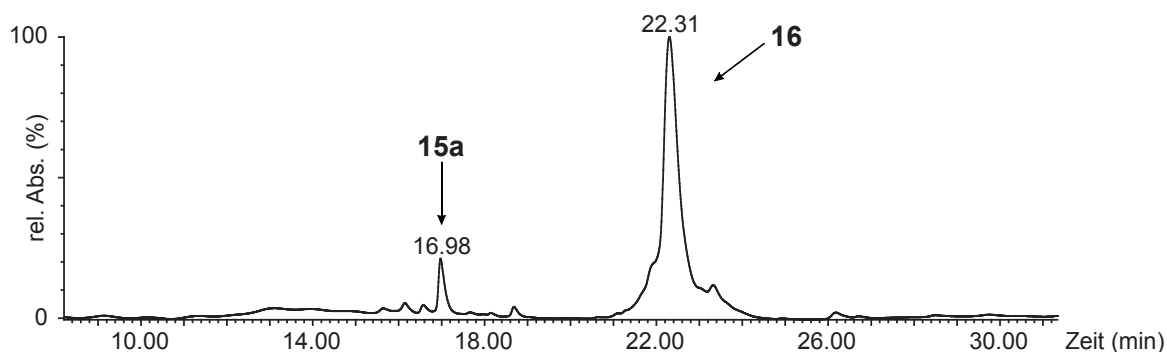


Abbildung 55. Analytische RP-HPLC der Ligation zu RNase Thz-26-124, Asn34 Nona **16**

Nach dem Reaktionsende wurde das Thiazolidin durch Behandlung mit Methoxyamin geöffnet. Dazu wurde die Ligationslösung mit dem gleichen Volumen Ligationspuffer mit 0.2 M Methoxyamin versetzt, was einer Endkonzentration von 0.1 M Methoxyamin entsprach.

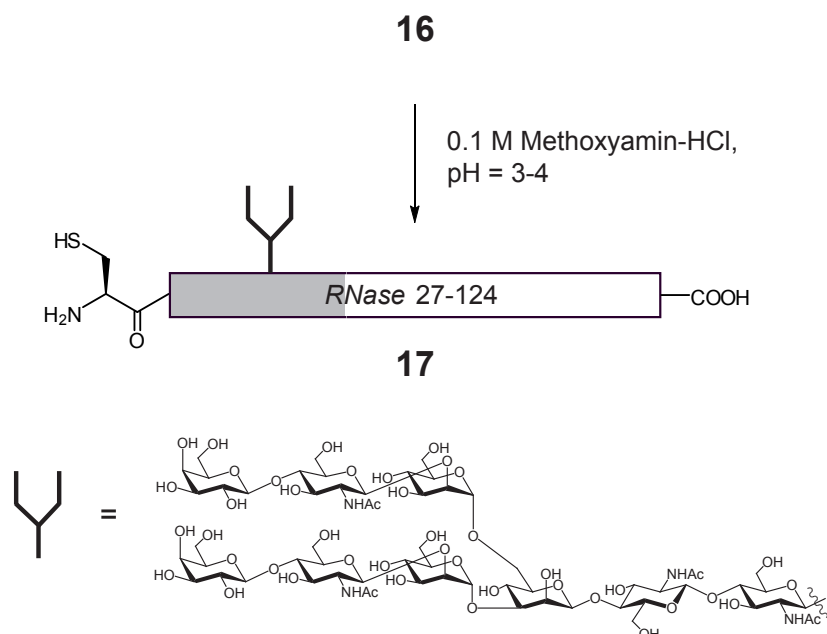


Abbildung 56. Thiazolidinöffnung zu RNase 26-124, Asn34Nona **17**

Die Reaktionskontrolle der Freisetzung erfolgte nach 4 bzw. 21 Stunden mittels LC-MS-Analyse. Dabei zeigte sich nach 4 h im RP-HPLC-Elutionsprofil ein Doppelpeak, dessen

rechte Hälfte dem ursprünglichen Ligationsprodukt **16** zugeordnet werden konnte und der linke Teil dem gewünschten Abspaltungsprodukt **17** entsprach (Abbildung 57 a). Es konnten also ohne Optimierung des HPLC-Gradienten zwei 12.6 kDa-Peptide, die sich nur um ein einziges Kohlenstoffatom unterscheiden, analytisch getrennt werden. Das entschützte Produkt **17** eluierte auf Grund seines weniger hydrophoben Charakters früher von der verwendeten RP-Säule. Nach 21 h Inkubation konnte im HPLC-Profil nur noch ein Hauptpeak bei 19.65 min detektiert werden, der dem Peptid *RNase* 26-124 **17** ohne Thiazolidin entsprach (Abbildung 57 b).

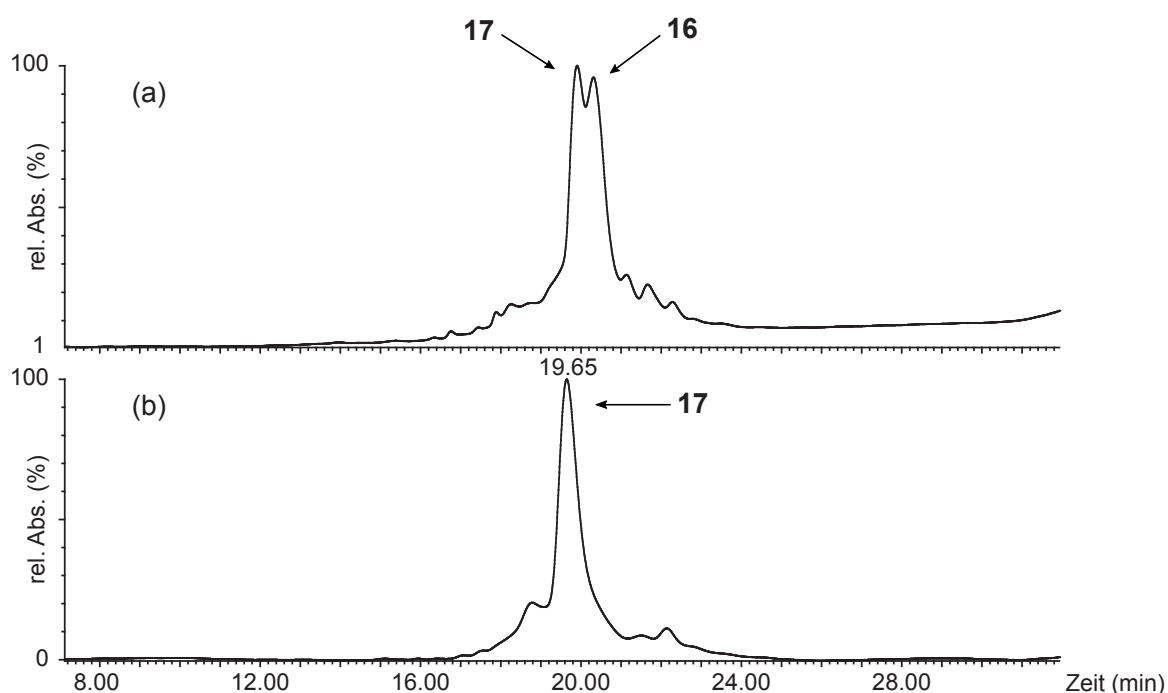


Abbildung 57. Analytisches HPLC-Profil der Thiazolidinöffnung zu *RNase* 26-124, Asn34Nona **17** (a) Abspaltung nach 4 h, (b) Abspaltung nach 21 h.

Die Untersuchung der entsprechenden Peaks mit ESI-MS zeigte die mehrfach positiv geladenen Kationen von **16** und **17**. Im direkten Vergleich beider Spektren ist die durch den Verlust eines Kohlenstoffatoms resultierende Massendifferenz von 12 Da zu erkennen (Abbildung 58 a und b).

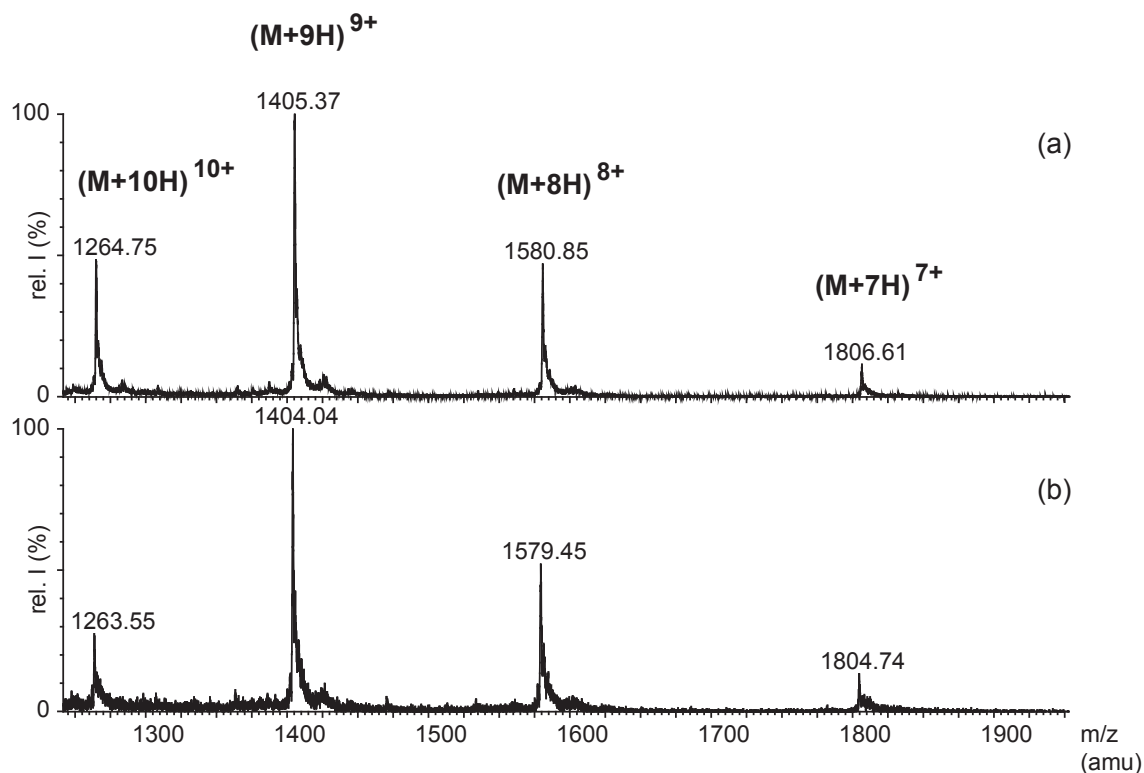


Abbildung 58. ESI-MS-Spektrum von RNase Thz-26-124, Asn34Nona **16** (a) und RNase 26-124, Asn34Nona **17** (b)

Nach erfolgreicher Freisetzung des N-terminalen Cysteins folgte im Anschluss die Ligation mit dem Thioester RNase 1-25 **18**,^[141] um die komplette RNase 1-124 **19** mit einem komplexen N-Glycan zu gewinnen (Abbildung 59).

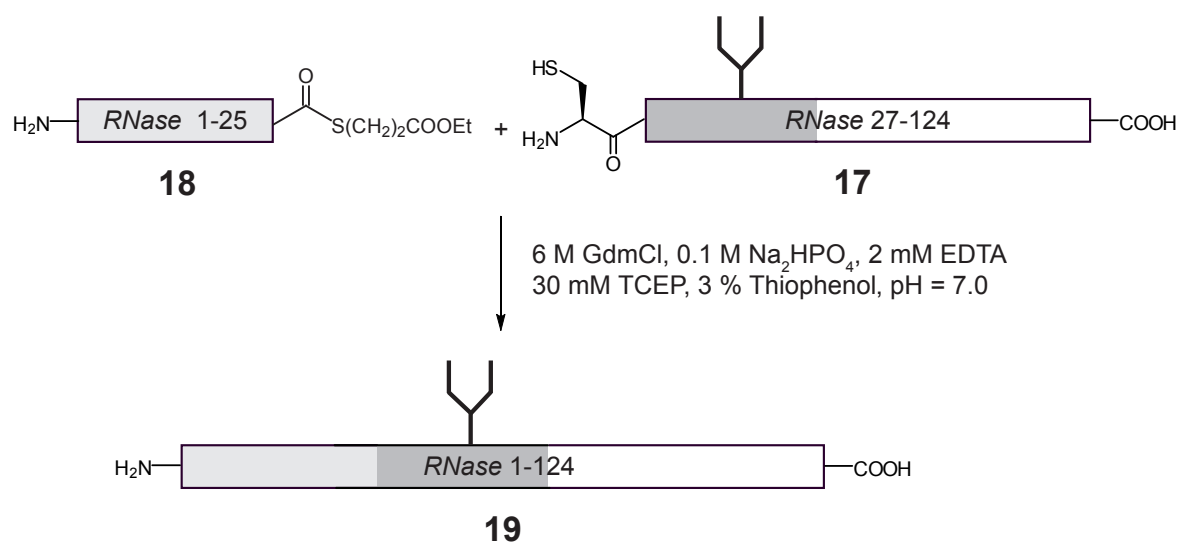


Abbildung 59. Ligation zu RNase 1-124, Asn34Nona **19**

Dazu wurde ein dreifacher Überschuss von **18** in Ligationspuffer mit TCEP und EDTA gelöst und zur Reaktionslösung von **17** zugegeben. Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH vorsichtig auf einen Wert von 6.6 eingestellt. Nach einem Tag wurde die Reaktionsmischung mittels LC-MS analysiert, wobei durch ESI-MS in der linken Hälfte des Peaks bei 22.16 min das Volllängenligationsprodukt **19** nachgewiesen werden konnte (Abbildung 60).

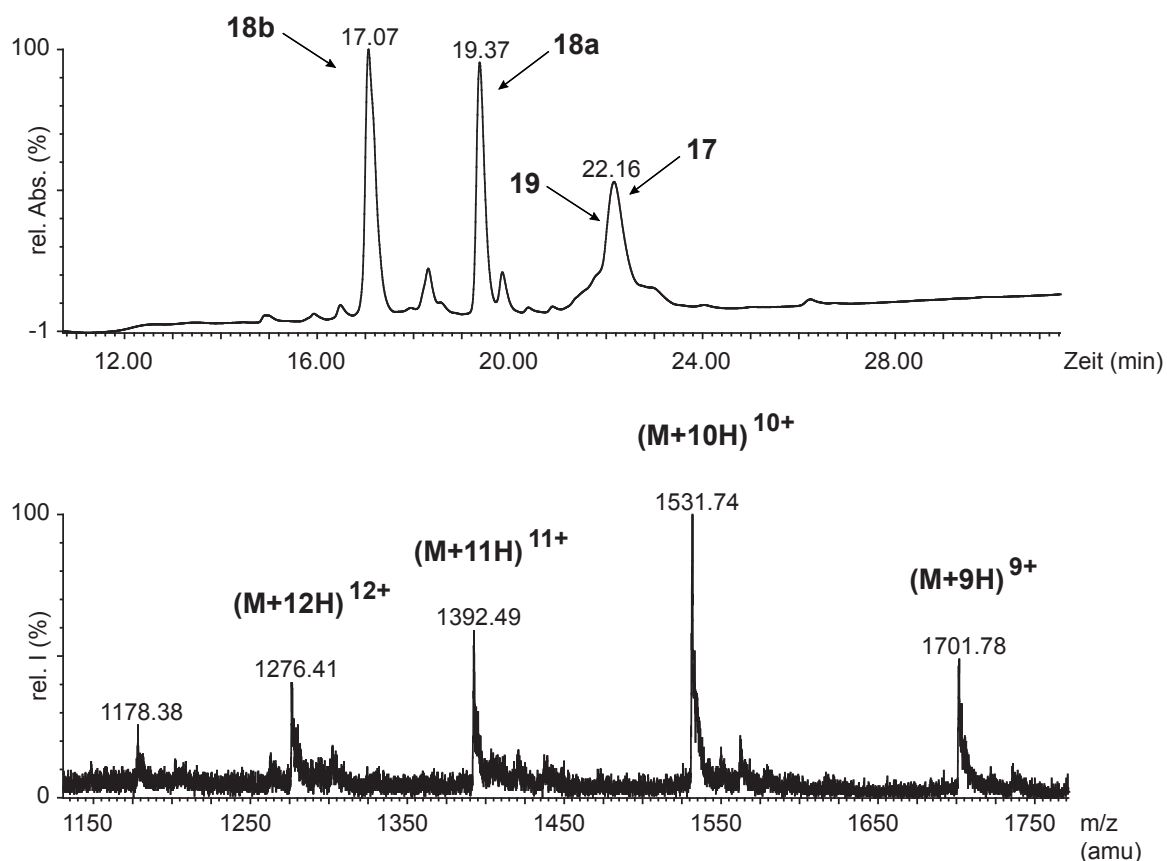


Abbildung 60. LC-MS-Charakterisierung der vollständigen RNase 1-124, Asn34 Nona **19**

Zusätzlich zum Produkt **19** konnte allerdings in diesem Peak auch restliches 26-124 **17** nachgewiesen werden, wofür möglicherweise der zu saure pH-Wert der Ligationslösung verantwortlich war. Außerdem konnte neben der Umesterung des Thioesters **18** zum reaktiven Phenylthioester **18a** eine Nebenreaktion von **18** beobachtet werden. Das ESI-MS-Spektrum zeigte, dass es sich hierbei um das Methoxyamid **18b** des Thioesters handelte (Abbildung 61). Das Verhältnis von Thioester zu Methoxyamid betrug nach einem Tag bei einem pH von 6.6 etwa 1:1. Um die Ligationsreaktion zu beschleunigen, wurde der pH-Wert deshalb mit 1 N NaOH stufenweise alkalischer eingestellt. Allerdings konnte ein

Fortschreiten der Ligation unter Verbrauch des Fragments *RNase* 26-124 **17** nicht mehr festgestellt werden.

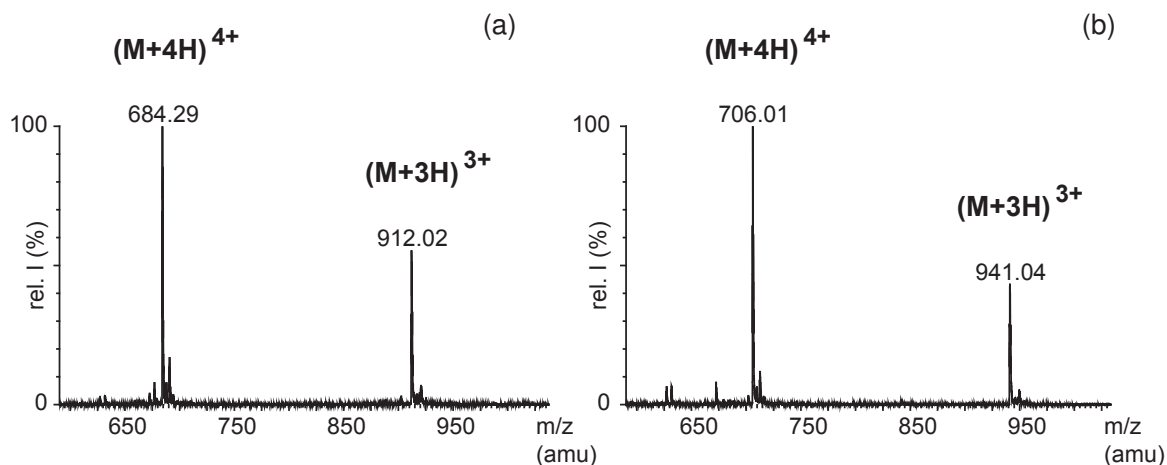


Abbildung 61. ESI-MS-Spektrum von Methoxyamid **18b** (a) und Thioester **18a** (b)

Stattdessen zeigte sich im HPLC-Chromatogramm mit zunehmender Inkubationszeit und höherem pH-Wert eine Zunahme vom Methoxyamid **18b** und eine Abnahme des Phenylthioesters **18a**, bis nach drei Tagen nur noch **18b** in der Ligationlösung nachgewiesen werden konnte (Abbildung 62). Eine weitere Zunahme des Ligationsproduktes *RNase* 1-124, Asn34Nona **19** konnte nicht beobachtet werden.

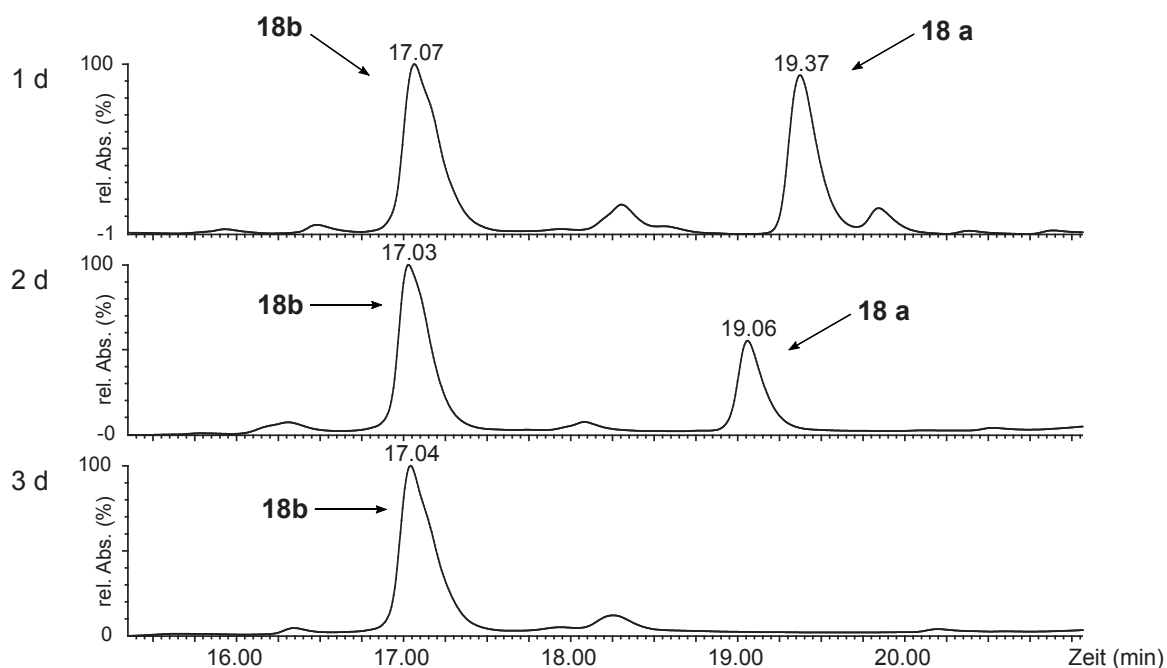


Abbildung 62. RP-HPLC der Bildung von Methoxyamid **18b** aus Thioester **18a**

Neben der Analyse mittels LC-MS wurden beide Ligationsschritte durch SDS-PAGE untersucht. Diese zeigte jeweils eine neu auftretende Bande im höhermolekularen Bereich. Da die untersuchten Ligationsprodukte ein komplexes N-Glycan tragen, ist bei der Gelelektrophorese das Migrationsverhalten nicht exakt proportional zum Molekulargewicht, wie dies normalerweise bei Proteinen zu erwarten wäre. Auf Grund des großen Oligosaccharidanteils erscheinen die Glycopeptide deshalb bei einem höheren Molekulargewicht als unglycosylierte Peptide mit der gleichen Masse (Abbildung 63).

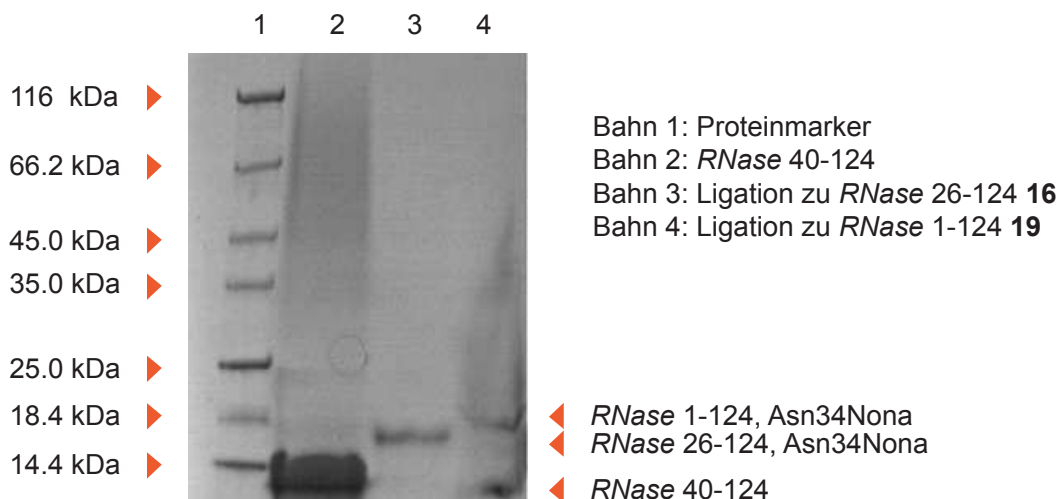


Abbildung 63. SDS-PAGE der Ligation zu *RNase* Thz-26-124, Asn34Nona **16** und *RNase* 1-124, Asn34Nona **19**

Obwohl durch die sequentielle Ligungsstrategie die Synthese einer vollständigen *RNase* mit einem komplexen Oligosaccharid erstmals gezeigt werden konnte, musste auf Grund der geringen Effizienz der zweiten Ligation eine alternative Strategie zur Synthese von **19** entwickelt werden. Dabei sollte die Verwendung einer alternativen Schutzgruppe zur Maskierung des Cysteins an Position 26 sowie die anschließende Freisetzung des N-terminalen Cys für die zweite Ligation untersucht werden.

5.2.8. Alternative Synthese von *RNase* 26-124, Asn34Nona

An Stelle der Thiazolidinschützung von Cys26 sollte eine photolabile Gruppe verwendet werden. Solche Schutzgruppen werden häufig in der Synthese organischer Moleküle verwendet,^[144] da sie selektiv durch Bestrahlung entfernt werden können. In der Synthese von Proteinen durch sequentielle native chemische Ligation wurde vor kurzem die Verwendung der photolabilen 4-(Dimethylamino)phenacyloxycarbonyl (Mapoc) Schutz-

gruppe beschrieben.^[38] Deshalb wurde für die erste Ligation der Thioester *RNase* 26-39 **20** verwendet, dessen N-terminales Cystein durch eine Mapoc-Gruppe geschützt war. Dazu wurde das SCE-geschützte Fragment **3** mit 1.03 Äquivalenten Glycopeptidthioester **20** in einem 6 M GdmCl/Na₂HPO₄ Puffer gelöst, der zur Reduktion TCEP enthielt. Die Reaktion wurde unter Argonatmosphäre mit Thiophenol aktiviert und anschließend in einem anaeroben Zelt bei 25 °C inkubiert, wobei mit Alufolie die Einwirkung von Sonnenlicht vermieden wurde.

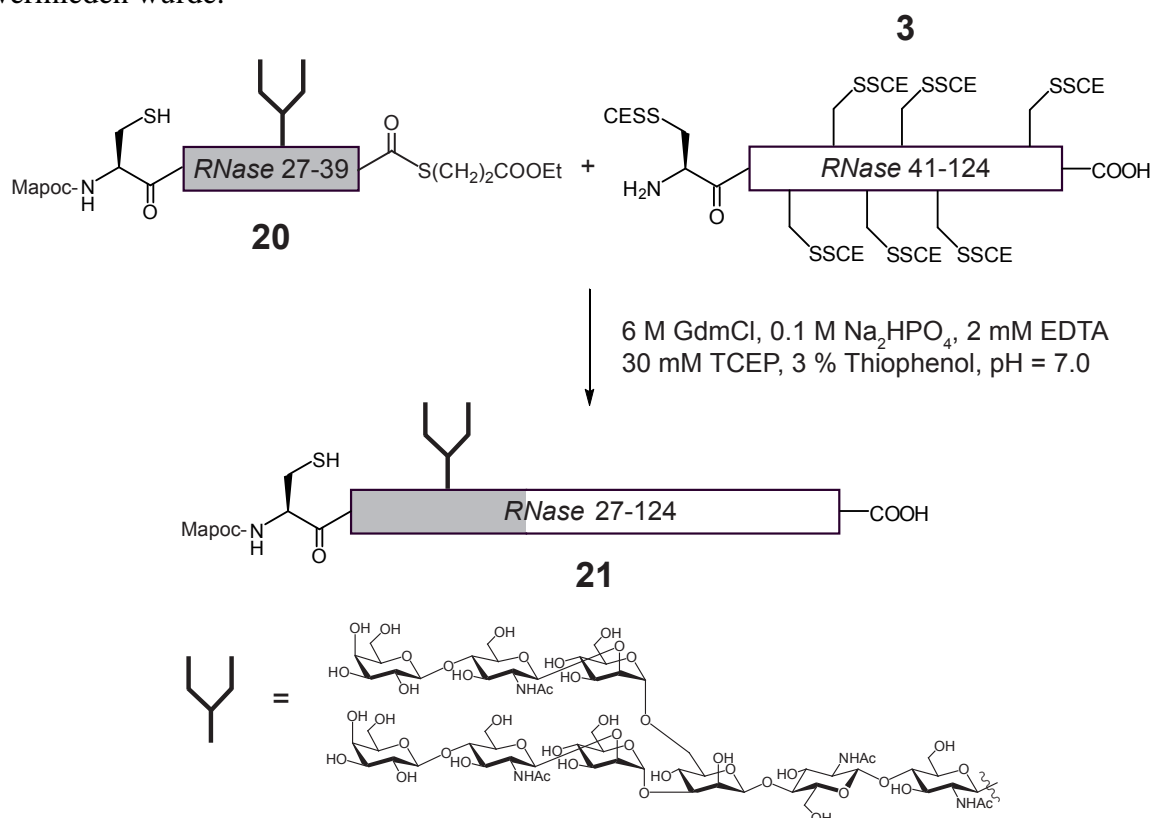


Abbildung 64. Ligation zu *RNase* Mapoc-26-124, Asn34Nona **21**

Um die Kinetik der Ligation zu untersuchen, wurde bei diesem Ansatz bereits nach einer Stunde unter Sauerstoffausschluss eine Probe entnommen und durch LC-MS analysiert. Dabei zeigte sich, dass der Thioester **20** noch in seiner ursprünglichen Form vorlag, also noch nicht zum Phenylthioester umgeestert war (Abbildung 65). Der Peak bei einer Elutionszeit von 22.21 min entsprach dem Fragment *RNase* 40-124. Durch das Einwirken von Thiophenol und TCEP lag dies in seiner entschützten Form mit freien Thiolen vor. Mit den hier vorliegenden stark denaturierenden und reduzierenden Bedingungen konnte das Fragment *RNase* 40-124 zum ersten mal in der unmodifizierten Form mit freien Cysteinen nachgewiesen werden, was bei der Isolierung nicht möglich war (vgl. 5.1.3). Das Ligationsprodukt **21** konnte nach einer Stunde noch nicht detektiert werden.

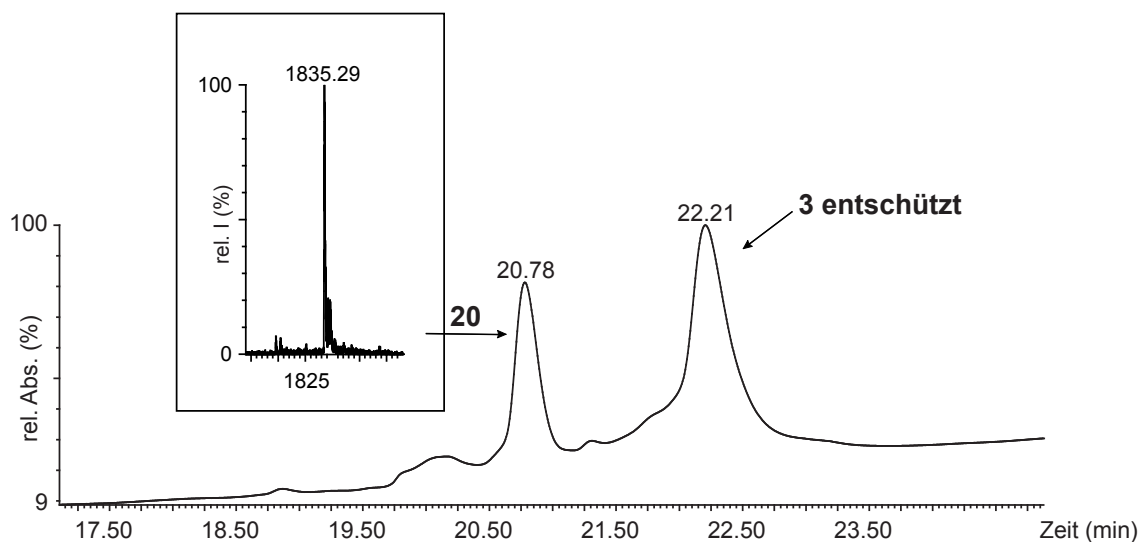


Abbildung 65. Analytisches HPLC-Profil der Ligationsmischung zu RNase Mapoc-26-124, Asn34Nona **21** nach 1 h

Das folgende ESI-MS-Spektrum entspricht dem reduzierten Fragment RNase 40-124 bei 22.21 min. Zu sehen sind die vier- bis achtfach geladenen Wasserstoffaddukte.

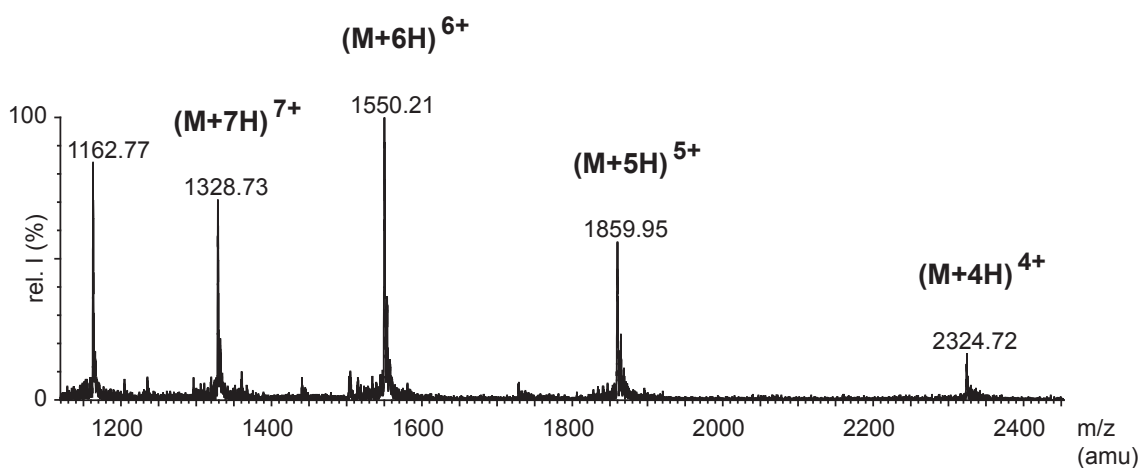


Abbildung 66. ESI-MS-Spektrum von reduzierter RNase 40-124

Nach zwei Tagen Inkubation unter anaeroben Bedingungen wurde der Ligationsansatz erneut mittels LC-MS analysiert. Es konnte nun als Hauptpeak das gewünschte Ligationsprodukt **21** nachgewiesen werden, wobei das Fragment RNase 40-124 völlig umgesetzt war. Nach erfolgreicher Ligation wurde die Mapoc-Schutzgruppe durch 20-minütige Bestrahlung mit einer 120 Watt Hg-Lampe (> 300 nm) abgespalten.

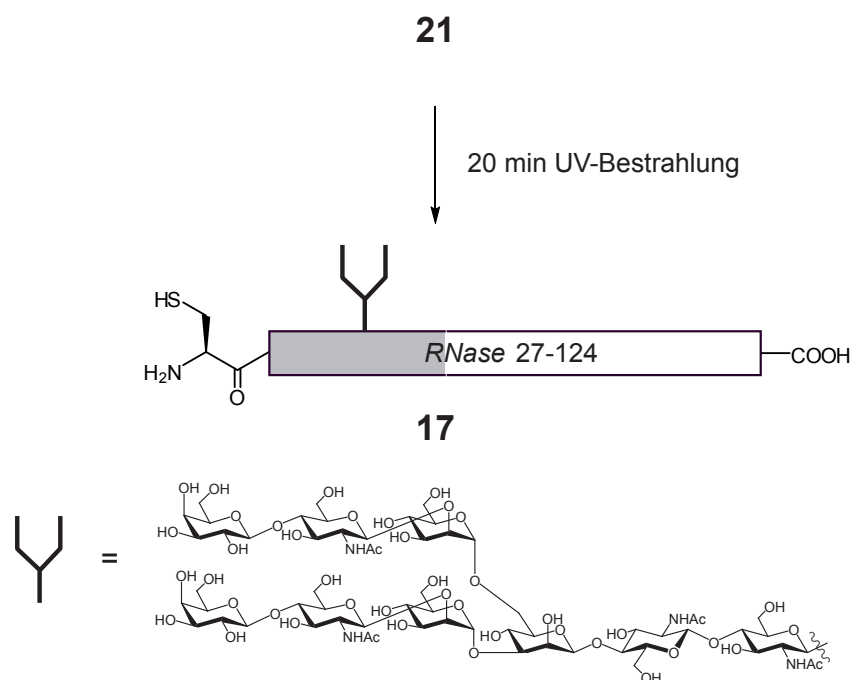


Abbildung 67. Abspaltung der Photoschutzgruppe zu RNase 26-124, Asn34Nona **17**

Das folgende RP-Profil zeigt den Vergleich zwischen der Ligation zu **21** nach zwei Tagen und der UV-Bestrahlung zu **17**. Durch Abspaltung der hydrophoben Mapoc-Schutzgruppe eluiert sowohl das entschützte Ligationsprodukt, als auch die Thiophenylform **20a** des im leichten Überschuss eingesetzten Thioesters früher von der RP-Säule.

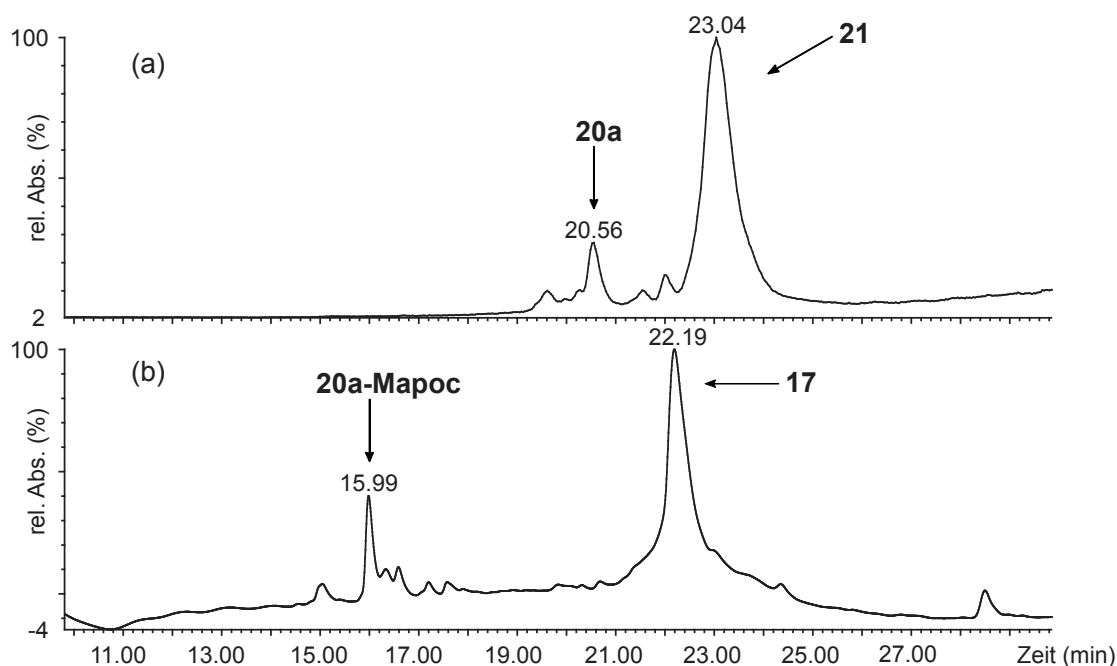


Abbildung 68. HPLC-Profil der Ligation von Thioester **20** und **3** nach 2 d (a) und nach 20-min UV-Bestrahlung (b)

In den korrespondierenden ESI-MS-Spektren ist der durch die Abspaltung der Mapoc-Schutzgruppe hervorgerufene Massenverlust von 205 Da zu erkennen. (Abbildung 69).

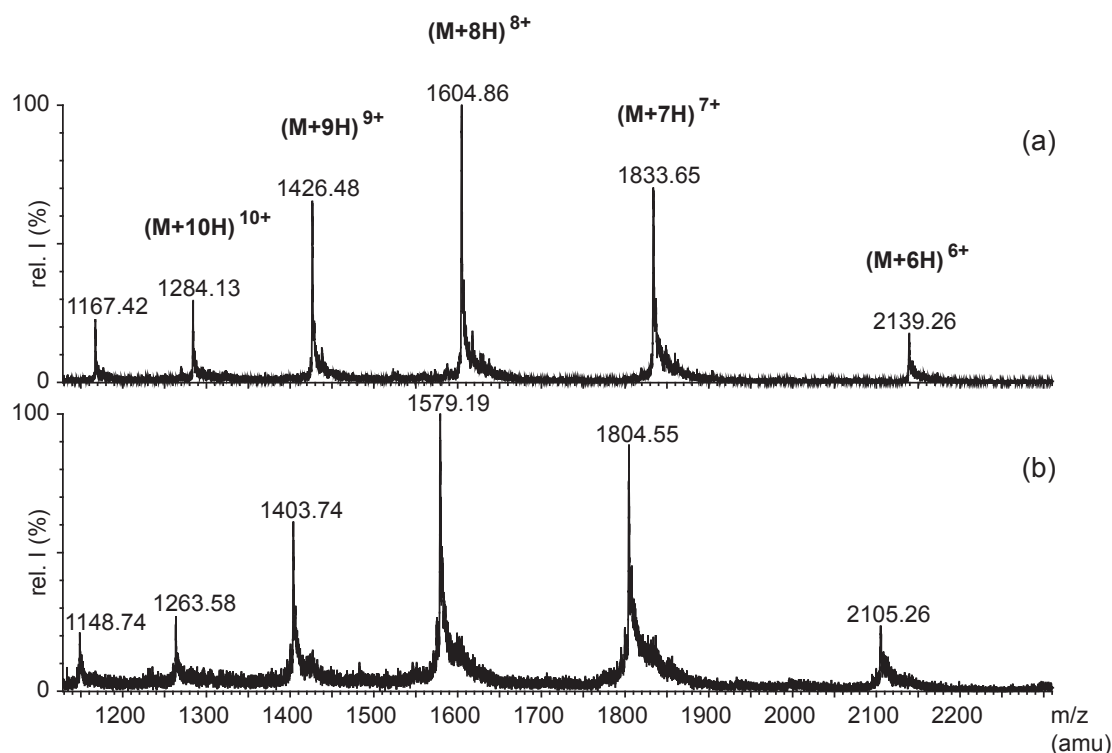


Abbildung 69. ESI-MS-Spektrum von **21** (a) und **17** (b)

Die Ligation zwischen dem Glycopeptidthioester *RNase* Mapoc-26-39 **20** und dem Fragment *RNase* 40-124 **3** konnte ebenfalls durch SDS-PAGE bestätigt werden. Es zeigte sich eine neue Bande in einem höheren Molekulargewicht als die 9.2 kDa Referenz *RNase* 40-124 auf Bahn 2 in Abbildung 70.

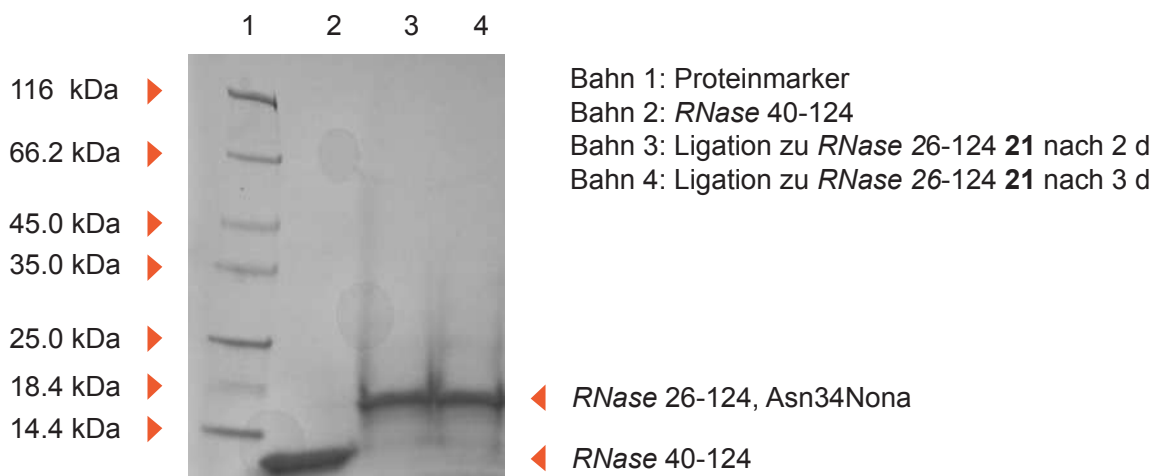


Abbildung 70. SDS-PAGE der Ligation zu *RNase* Mapoc-26-124, Asn34Nona **21**

Durch Zugabe des Thioesters *RNase* 1-25 **18** zur Ligationlösung nach der UV-Abspaltung sollte eine Ligation zur kompletten *RNase* 1-124 mit komplexem N-Glycan **19** stattfinden. Es trat jedoch auch nach verschiedensten Varianten der UV-Abspaltung (Variation von Gefäßmaterial, Zeit, Intensität, Kühlung, Thioladditiv) keine zweite Ligation zu **19** auf. Es wurde eine Radikalbildung der zahlreichen Thiole des ersten Ligationsproduktes **21** bzw. des Thiophenols^[145] während der UV-Bestrahlung vermutet, was zu unkontrollierten Nebenreaktionen führen könnte. Deshalb wurde versucht, die Cysteine von **21** und das Thiophenol vor der UV-Abspaltung als gemischte Disulfide zu schützen. Dazu wurde ein Ligationsansatz zu **21** nach zwei Tagen mit dem gleichen Volumen Ligationspuffer 2 ohne Thiophenol verdünnt, mit einem Überschuss an 2-Carboxyethyl-methanthiosulfonat versetzt und der pH-Wert auf 8.5 eingestellt.

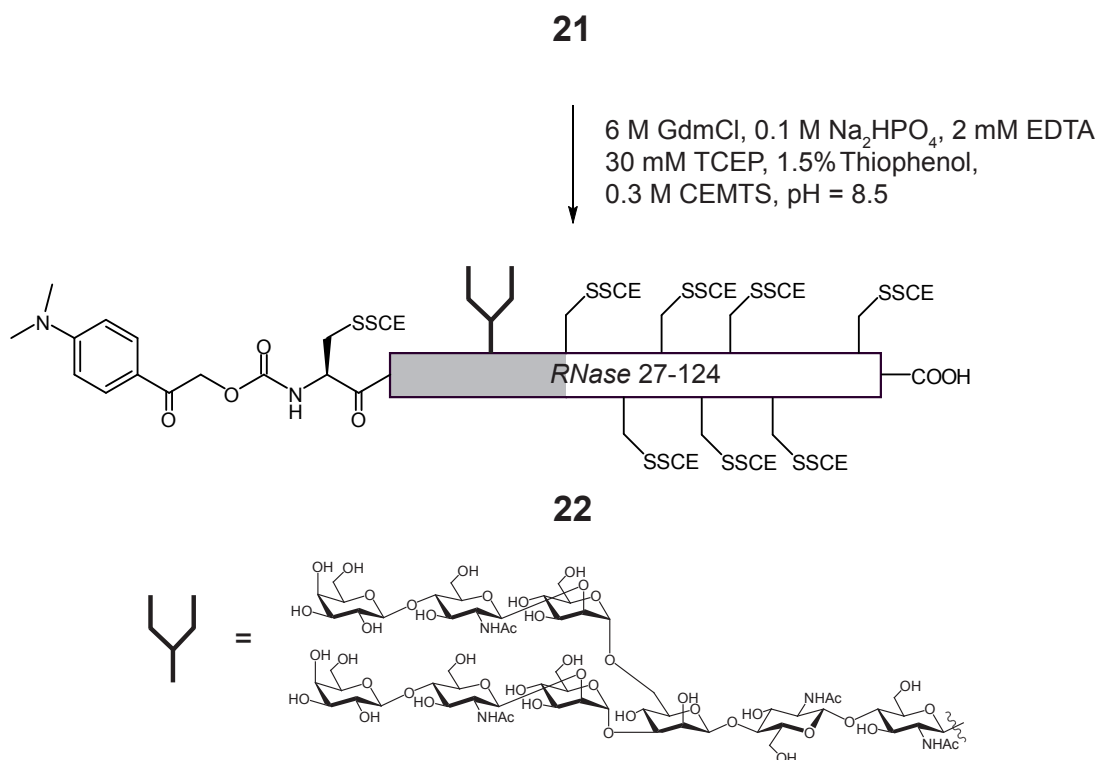


Abbildung 71. Synthese von *RNase* Mapoc-26-124, (SCE)₈ **22** aus **21**

Die vollständige Modifikation der Cysteine von **21** konnte nach Inkubation über Nacht durch eine LC-MS-Analyse bestätigt werden. Im ESI-MS Spektrum sind die sieben- bis zehnfach geladenen Kationen des durch Disulfide geschützten Ligationsproduktes **22** zu sehen (Abbildung 72).

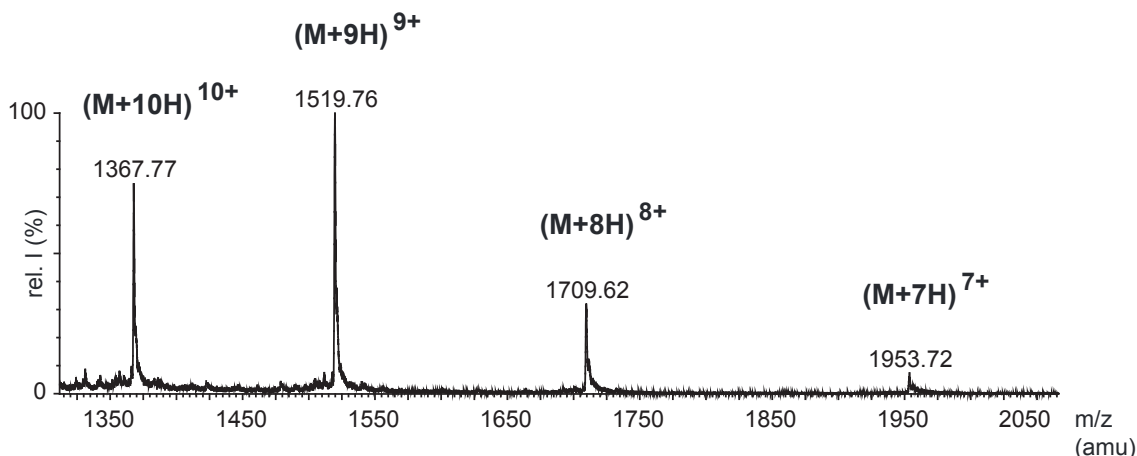


Abbildung 72. ESI-MS-Spektrum des cysteingeschützten Ligationsproduktes **22**

Nach vollständiger Schützung der Thiolgruppen sollte die photolabile Mapoc-Gruppe entfernt werden. Dazu wurde der Ansatz 20 min mit UV-Licht bestrahlt und anschließend mittels LC-MS-Analyse untersucht. Dabei stellte sich jedoch heraus, dass durch die Einwirkung des UV-Lichtes die gemischten Disulfide zum größten Teil wieder abgespalten wurden (nicht gezeigt). Die Modifikation der Cysteine bei der UV-Bestrahlung erwies sich damit als nicht praktikabel.

Auf Grund der unerwarteten und im Rahmen dieser Arbeit nicht zu lösenden Schwierigkeiten bei der Verwendung der photolabilen Mapoc-Gruppe, musste wieder auf die Thiazolidinmethode zurückgegriffen werden. Durch die Probleme, die das zur Öffnung des Thiazolidinringes benötigte Methoxyamin verursacht (Umwandlung des Thioesters **18** zum unreaktiven Methoxyamid **18b**, vgl. 5.2.7), wurde anstelle der ursprünglich geplanten sequentiellen Eintopf-Ligationsstrategie ein alternativer Syntheseweg über die Isolierung des Ligationsproduktes *RNase* 26-124 nach der Methoxyaminentschützung untersucht.

5.2.9. Synthese von *RNase* 1-124, [Asn34Pra]

Zur Optimierung von Reaktions- und Reinigungsbedingungen sollte bei der sequentiellen Ligation die Isolierung des entschützten Ligationsproduktes zunächst durch die Synthese einer unglycosylierten *Ribonuclease* überprüft werden. Diese sollte an Position 34 an Stelle des nativen Asparagins ein Propargylglycin (Pra) tragen.

Da es bei der Festphasensynthese von Glycopeptiden nach Einfügen der Glycosylaminosäure oftmals zu Schwierigkeiten bei der Kopplung der folgenden Aminosäuren kommen kann, ist die nachträgliche Anknüpfung von Oligosacchariden an Peptide eine vielversprechende Alternative. Diese benötigt jedoch meist eine aufwändige Schutzgruppenstrategie und spezielle Reaktionsbedingungen. Diese Einschränkungen können durch Verwendung von spezifisch komplementären funktionellen Gruppen, die nur einmalig im Protein bzw. im Oligosaccharid vorkommen, umgangen werden. Auf diese Weise ist der schnelle Zugang zu sog. Neoglycopeptiden möglich. Diese besitzen zwar keine native Verknüpfung zwischen Protein und Zucker, sind aber schnell und einfach herstellbar und können als Analoga zu strukturellen Untersuchungen verwendet werden. Die Verwendung eines Propargylglycins mit terminaler Alkinfunktionalität ermöglicht eine solche Gewinnung von uniformen Neoglycopeptiden. Durch die nach *Huisgen* benannte 1,3-dipolare Cycloaddition^[146] können Azide mit Alkinen zu Triazolen umgesetzt werden. In Analogie können Oligosaccharidazide über eine regiospezifische Cu(I)-katalysierte 1,3-dipolare [3+2]-Cycloaddition an Alkinfunktionen „geclickt“ werden (Click-Glycosylierung). Durch die Verwendung von Pra als Alkineinheit könnte so eine Verknüpfung zwischen Protein und Zucker über ein Aza-Histidin-Analogon erfolgen.^[147]

Für die Synthese von *RNase* 1-124, [Asn34Pra] wurde zunächst der Thioester **23**^[148] mit einer äquimolaren Menge an *RNase* 40-124 **3** in einem 6 M GdmCl Ligationspuffer mit TCEP und EDTA gelöst und die Reaktion durch Zugabe von Thiophenol gestartet (vgl. Abbildung 73). Anschließend wurde unter Sauerstoffausschluss in einem anaeroben Zelt für zwei Tage inkubiert. Die Ligation wurde durch LC-MS und durch eine SDS-PAGE analysiert. Die LC-MS Untersuchung zeigte eine erfolgreiche Ligation, wobei keine *RNase* 40-124 mehr nachgewiesen werden konnte. Im RP-HPLC-Profil war nur noch ein geringer Anteil des Thioesters *RNase* Thz-26-39, [Asn34Pra] zu sehen. Dieser lag zu 50 % in seiner ursprünglichen Form vor und war zu 50 % durch zugesetztes Thiophenol zum Thiophenylthioester umgeestert (vgl. Abbildung 75 a).

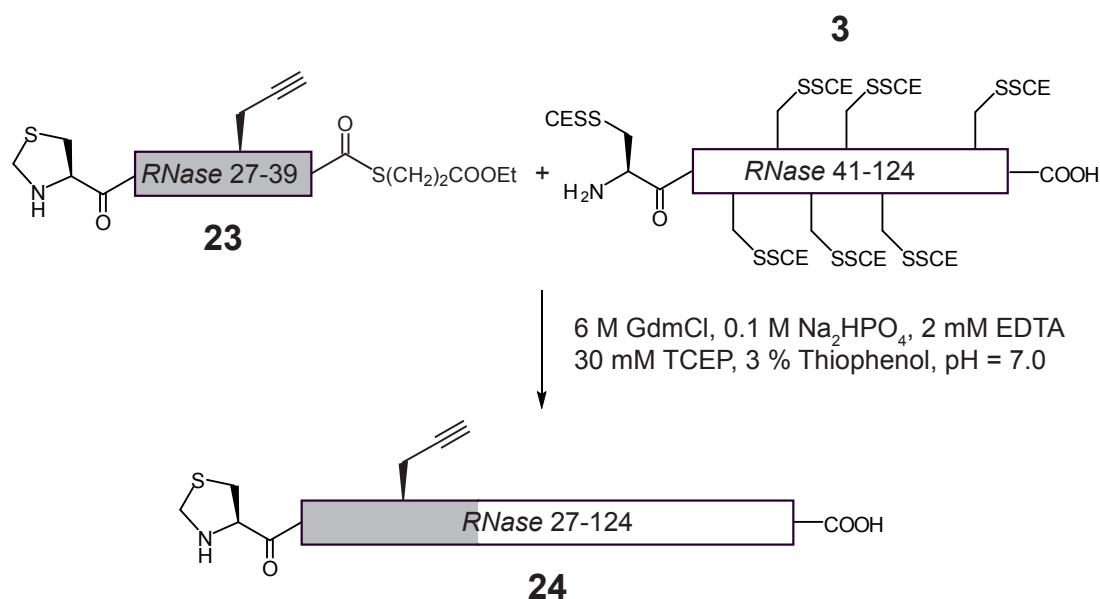


Abbildung 73. Ligation zu RNase Thz-26-124, [Asn34Pra] **24**

Die Öffnung des Thiazolidins gelang durch Zugabe des gleichen Volumens an 0.2 M Methoxyamin in Ligationspuffer 2 direkt zur Ligationmischung. Der pH-Wert wurde im Anschluss auf einen Wert von 3-4 eingestellt. Die Entnahme der Proben für die LC-MS-Analyse, sowie die Zugabe des Abspaltungspuffers zur Ligationmischung wurde dabei unter anaeroben Bedingungen durchgeführt.

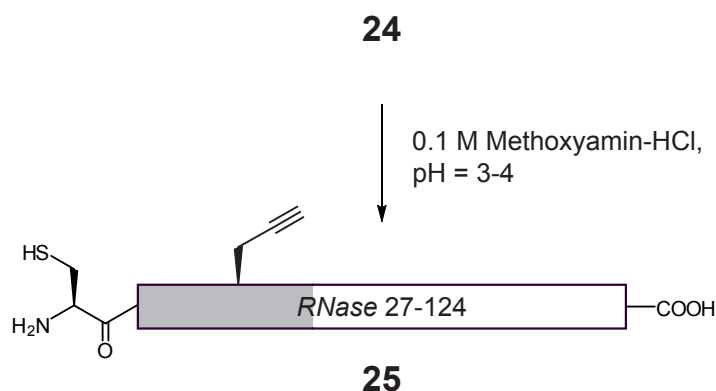


Abbildung 74. Thiazolidinöffnung zu RNase 26-124, [Asn34Pra] **25**

Nach 21 h wurde die Abspaltung durch eine LC-MS-Analyse kontrolliert. Der Vergleich der RP-HPLC-Profile zeigte eine Verschiebung der Retentionszeit um 0.5 min, was durch den Verlust eines Kohlenstoffatoms und damit eines hydrophileren Charakters von **25** im Vergleich zu **26** erklärt werden kann (Abbildung 75).

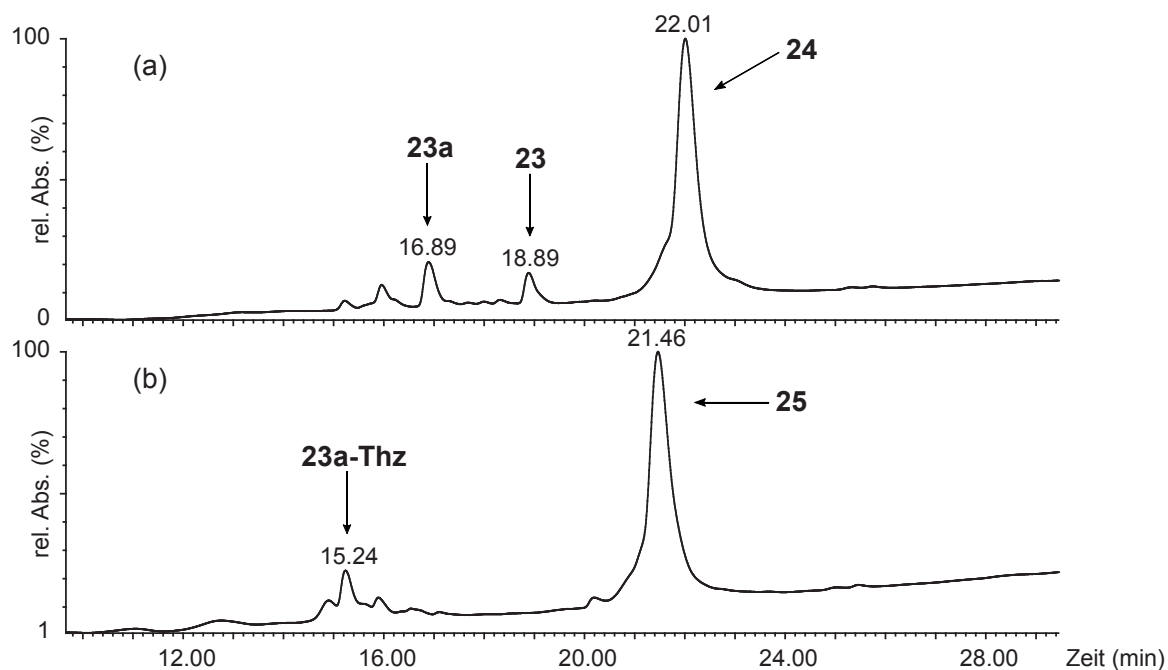


Abbildung 75. HPLC-Profil der Ligation zu RNase Thz-26-124, [Asn34Pra] **24** (a) und Thiazolinöffnung zu RNase 26-124, [Asn34Pra] **25** (b)

Die selektive Einwirkung des Methoxyamins auf den Thioesters **23a** ist ebenfalls durch eine frühere Elutionszeit zu erkennen (15.24 min für den entschützten Thioester **23a**). Die ESI-MS-Spektren der Ligationsprodukte **24** und **25** bestätigten die durch die Öffnung des Thiazolidinringes hervorgerufene Massendifferenz von 12 Da.

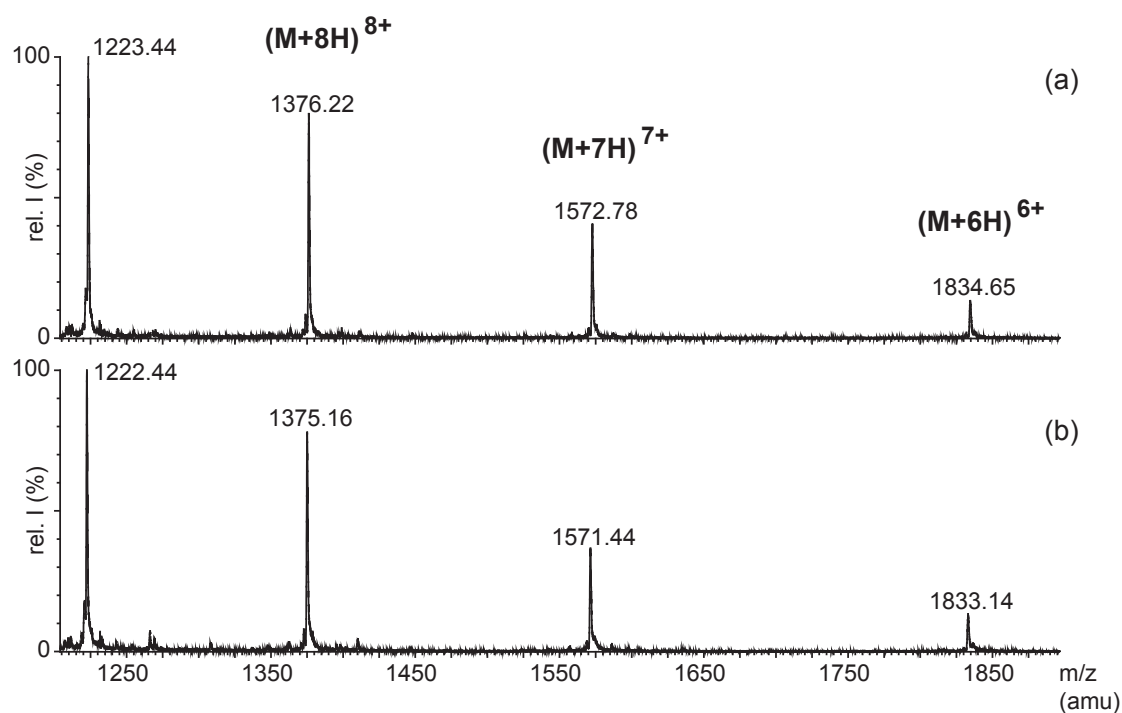


Abbildung 76. ESI-MS-Spektrum von **24** (a) und **25** (b)

Nach der Freisetzung des N-terminalen Cysteins wurde das entschützte Ligationsprodukt durch Gelfiltration in 10 % Acetonitril/0.1 % Ameisensäure isoliert. Nach Eindampfen der vereinigten Fraktionen konnte eine Ausbeute von 44 % erhalten werden. Das isolierte Produkt **25** sollte anschließend mit dem Thioester **18** zur vollständigen *RNase* 1-124, [Asn34Pra] **26** ligiert werden. Der Ligationspuffer enthielt an Stelle von Thiophenol als Thioladditiv (4-Carboxymethyl)thiophenol (MPAA). Die Verwendung von MPAA sollte sich positiv auf die Geschwindigkeit der Ligation auswirken. Wie kinetische Untersuchungen zeigten, ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der nativen chemischen Ligation der Thiol-Thioester Austausch.^[149] Weiterhin ist die Reaktivität des gebildeten Thioesters von entscheidender Bedeutung für den Fortgang der Ligation. Ein optimaler Thiolkatalysator sollte also einen reaktiven Thioester gegenüber dem N-terminalen Cystein formen (gute Abgangsgruppe) sowie eine schnelle und vollständige Umesterungsreaktion mit dem eingesetzten Alkylthioester gewährleisten. Alle diese Eigenschaften vereint MPAA mit einem pK_a -Wert von 6.6 in sich. Neben einer im Vergleich zu Thiophenol 10-fach höheren Ligationsgeschwindigkeit ist MPAA zudem sehr gut wasserlöslich, fast geruchslos und ein leicht handhabbarer Feststoff.

Für die Ligation zu **26** wurden 0.16 mg isoliertes Peptid **25** mit einem dreifachen Überschuss an Thioester *RNase* 1-25 **18** in Ligationspuffer 3 (6 M GdmCl, 0.1 M Na_2HPO_4 , 2 mM EDTA, 30 mM TCEP, 200 mM MPAA, pH = 7.0) gelöst und für einen Tag unter anaeroben Bedingungen bei 25 °C inkubiert (Abbildung 77).

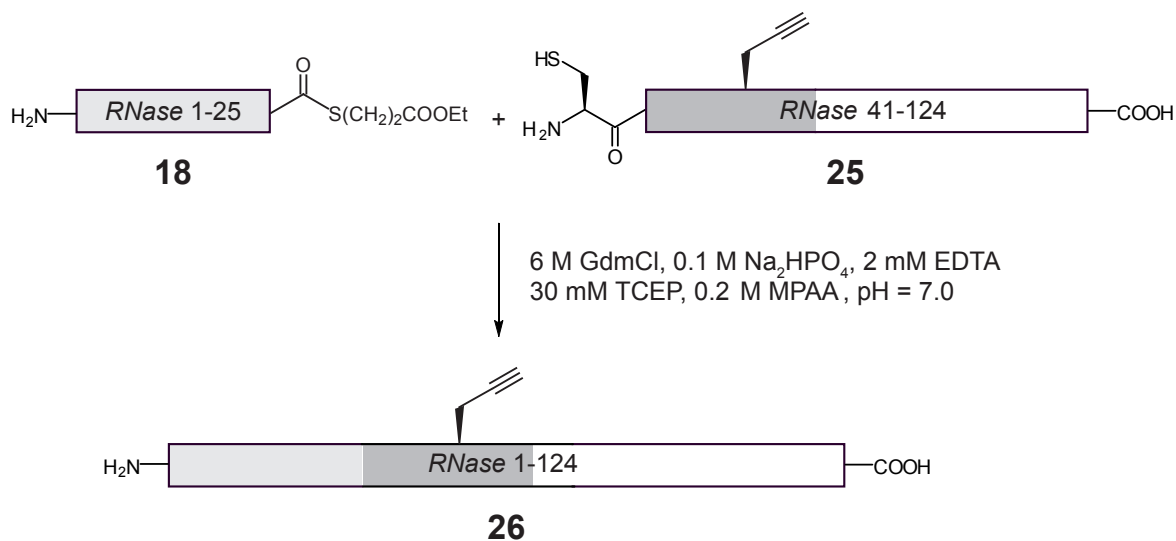


Abbildung 77. Ligation zu *RNase* 1-124, [Asn34Pra] **26**

Nach einem Tag wurde die Reaktion durch eine LC-MS-Analyse untersucht. Im HPLC-Profil konnte dem Peak mit einer Elutionszeit von 21.07 min die gewünschte Masse des Produktes *RNase* 1-124, [Asn34Pra] **26** von 13.6 kDa zugewiesen werden. Zu sehen sind die acht- bis elffach geladenen Kationen des Peptids. Der im Überschuss eingesetzte Thioester **18** konnte auch als MPAA-Ester **18c** in einem Verhältnis von etwa 60:40 detektiert werden.

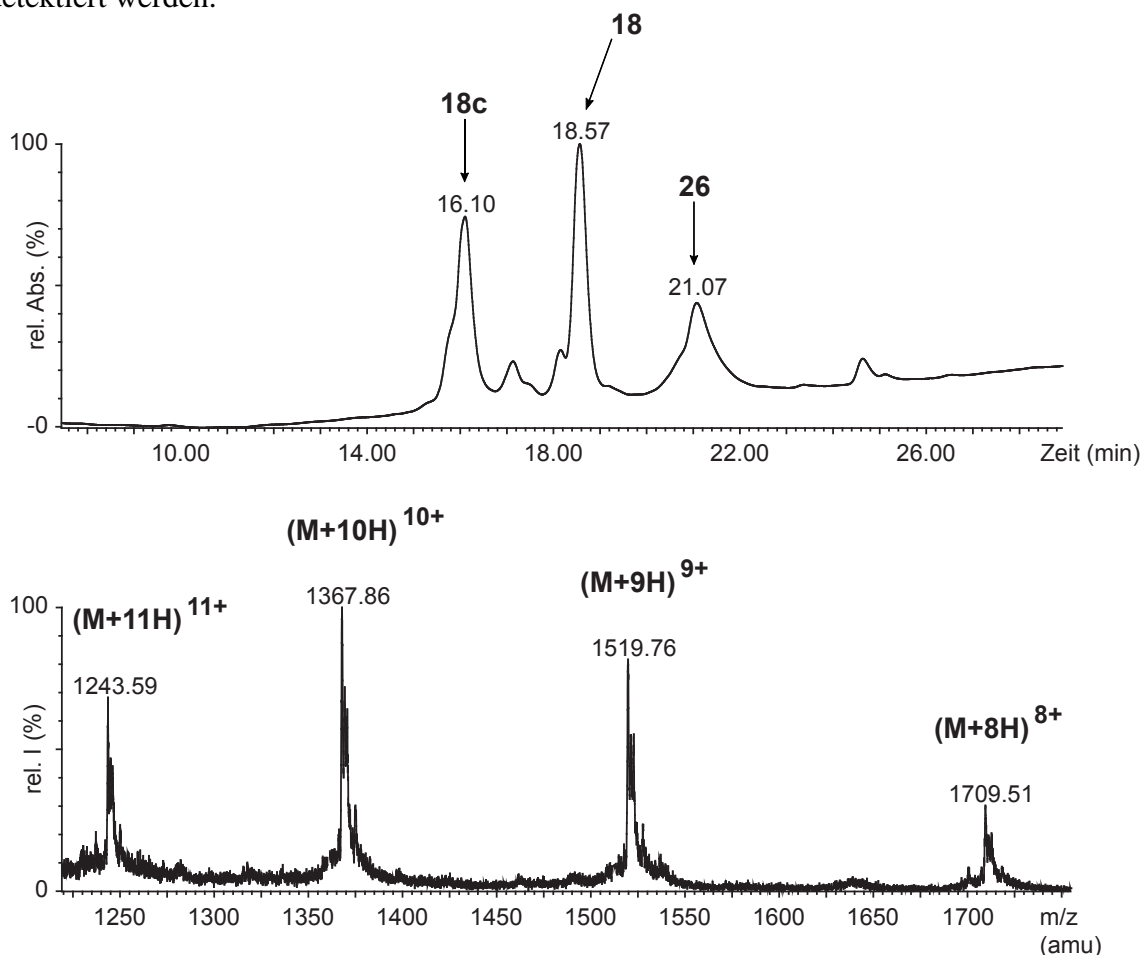


Abbildung 78. LC-MS-Analyse der Ligation zu *RNase* 1-124, [Asn34Pra] **26**

Neben der LC-MS-Analyse wurden beide Ligationen mittels SDS-PAGE untersucht. Da die beiden Ligationsprodukte **24** und **26** kein komplexes N-Glycan tragen, sollte sich das Wanderungsverhalten auf dem Gel proportional zum Molekulargewicht verhalten. In Abbildung 79 sind beide Ligationen mit *RNase* 40-124 als zusätzliche Referenz dargestellt. Man erkennt nach jeder Ligation die stufenweise Größenzunahme der jeweiligen Produkte im Vergleich zur *RNase* 40-124. Die neu entstandenen Banden liegen im erwarteten Bereich von 11 kDa bzw. 13.6 kDa. Das Zielprotein **26** wurde im Anschluss über eine Gelfiltration isoliert und lyophilisiert. Nach vollständiger Reduktion und Rückfaltung wurde ein Aktivitätstest durchgeführt (vgl. 5.2).

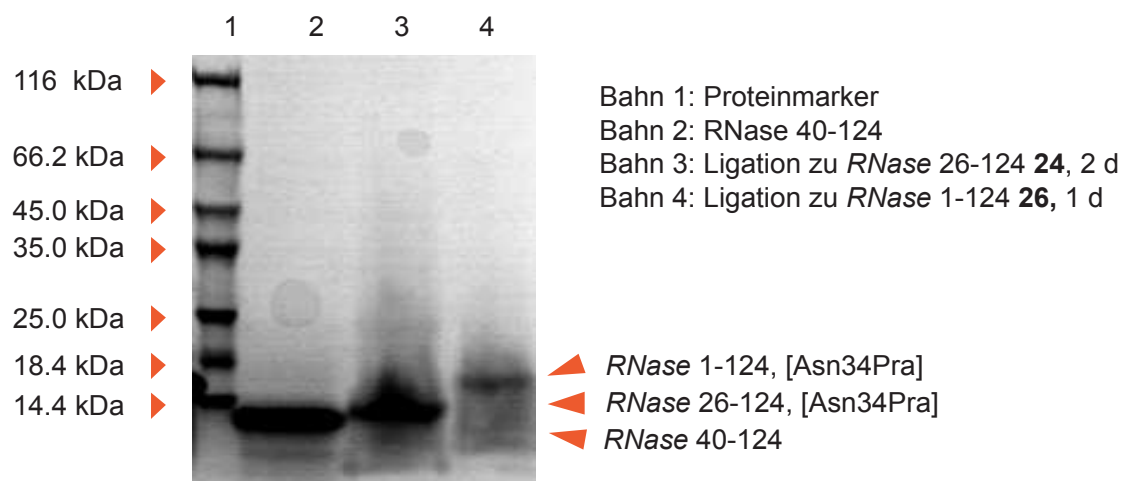


Abbildung 79. SDS-PAGE der Ligation zu RNase Thz-26-124, [Asn34Pra] **24** und RNase 1-124, [Asn34Pra] **26**

Die Durchführbarkeit der sequentiellen Ligation mit einer Isolierung des entschützten Ligationsproduktes konnte durch LC-MS, SDS-PAGE und später durch den Nachweis enzymatischer Aktivität (vgl. 5.3) bestätigt werden.

5.2.10. Synthese von RNase 1-124, Asn34GlcNAc, [Met30Nle, Met31Nle]

Nach der Synthese von **26** sollte die verbesserte Ligungsstrategie auf die Gewinnung von glycosylierter *Ribonuclease* übertragen werden. Der dazu verwendete Thioester **27** trägt neben einem GlcNAc-Rest an Asn34 auch Norleucin an Position 30 und 31.^[150] In der nativen Sequenz befindet sich an diesen Stellen jeweils Methionin. Bei der Festphasensynthese kann es unter bestimmten Reaktionsbedingungen zu einer Oxidation des Schwefels von Methionin kommen. Da hierbei diastereomere Sulfoxide entstehen, kommt es zu einer Mischung aus verschiedenen Peptiden mit unterschiedlichen Sulfoxidisomeren. Die Verwendung von Norleucin ersetzt das Schwefelatom durch eine nicht oxidationsempfindliche Methylengruppe, was in den meisten Fällen eine vernachlässigbare Wirkung auf Faltung und Aktivität des entsprechenden Proteins hat.^[151]

Für die Synthese von **28** wurden äquimolare Mengen von Glycopeptidthioester RNase Thz-26-124, Asn34GlcNAc, [Met30Nle, Met31Nle] **27** und vollständig SCE-geschütztes Fragment RNase 40-124 **3** in Ligationspuffer 2 gelöst und zwei Tage unter anaeroben Bedingungen inkubiert (Abbildung 80).

Nach 48 h wurde das Fortschreiten der Ligation durch LC-MS-Analyse untersucht. Das RP-HPLC-Profil zeigte einen Hauptpeak bei 21.84 min, der dem Ligationsprodukt **28** zugeordnet werden konnte. Reste des Fragments *RNase* 40-124 konnten nicht detektiert werden, ebenso nur noch Spuren des Thioesters **27** (vgl. Abbildung 82).

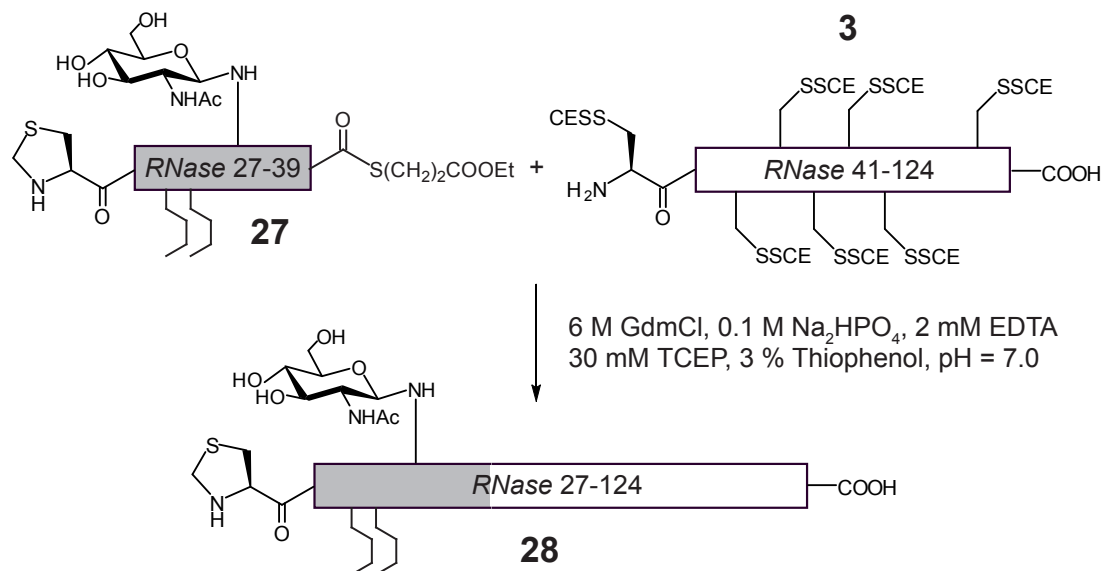


Abbildung 80. Ligation zu *RNase* Thz-26-124, Asn34GlcNAc, [Met30Nle, Met31Nle] **28**

Nach der Ligation wurde das Thiazolidin geöffnet. Dies gelang durch Zugabe des gleichen Volumens an Ligationspuffer 2 ohne Thiophenol, der 0.2 M Methoxyamin bei einem pH-Wert von 2.0 enthielt. Es ergab sich eine Endkonzentration von 0.1 M Methoxyamin.

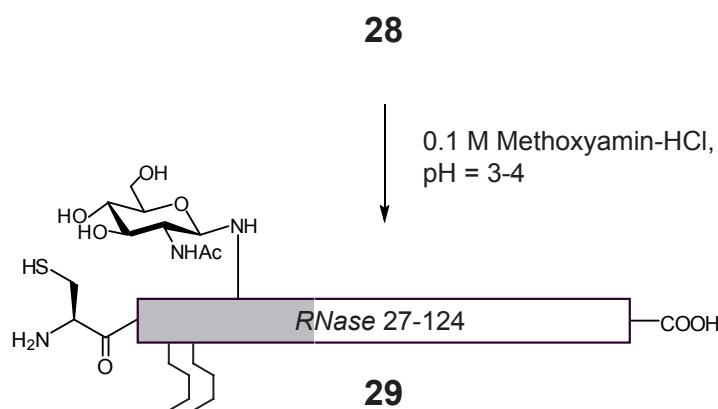


Abbildung 81. Thiazolidinöffnung zu *RNase* 26-124, Asn34GlcNAc, [Met30Nle, Met31Nle] **29**

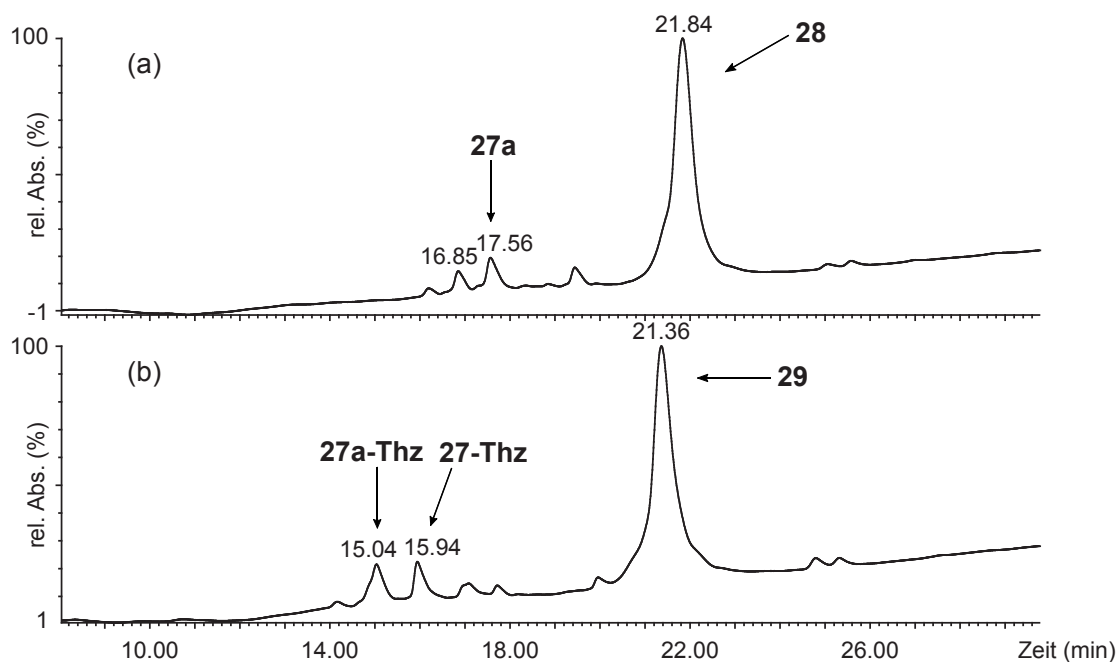


Abbildung 82. HPLC-Profil der Ligation zu RNase Thz-26-124, Asn34GlcNAc, [Met30Nle, Met31Nle] **28** (a) und Thiazolidinöffnung zu RNase 26-124, Asn34GlcNAc, [Met30Nle, Met31Nle] **29** (b)

Die ESI-MS-Spektren der entsprechenden Peaks zeigten die erwartete Massendifferenz von 12 Da.

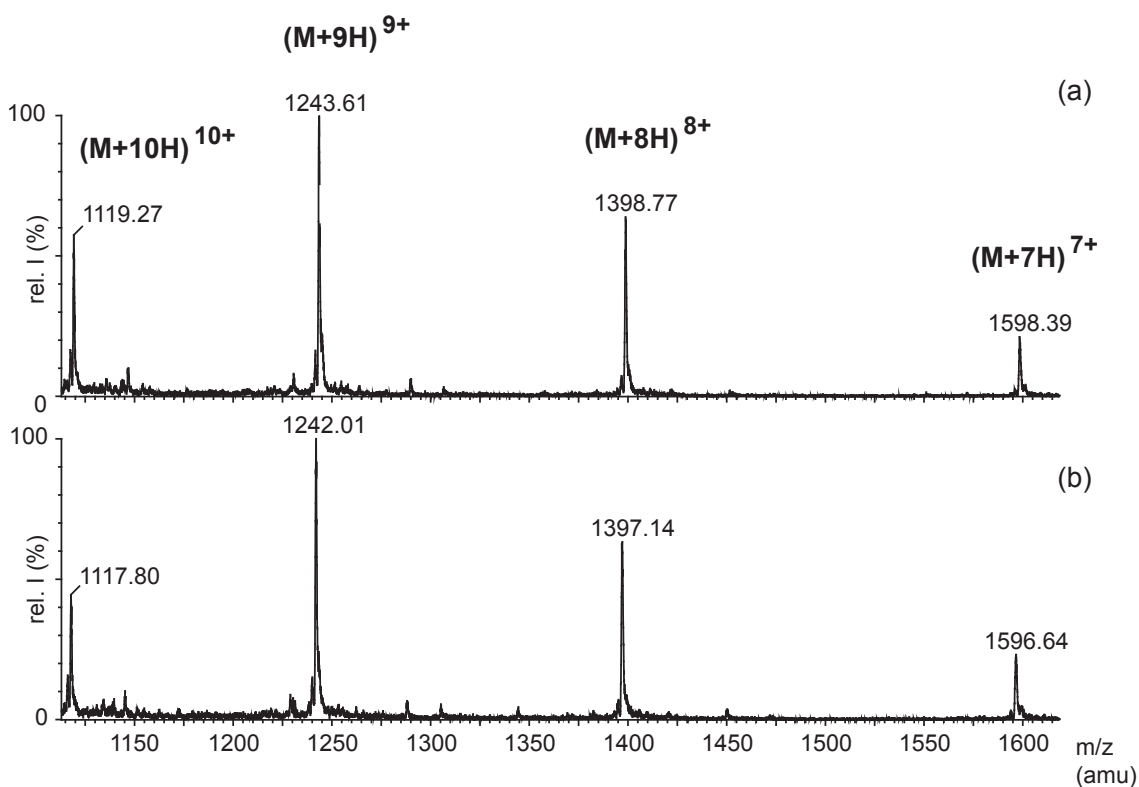


Abbildung 83. ESI-MS-Spektrum von **28** (a) und **29** (b)

Nach der Abspaltung wurde dem Ansatz zunächst frisches TCEP in Ligationspuffer zugesetzt und bei einem pH-Wert von 6.0 reduziert. Dadurch sollte die Aggregationstendenz bei der nachfolgenden Reinigung verringert werden, bzw. bereits durch Oxidation ausgefallenes Produkt wieder in Lösung gebracht werden. Anschließend wurde 30 % iges Acetonitril zugegeben, um eine Endkonzentration von 25 % Acetonitril zu erreichen. Danach wurde das Protein durch Gelfiltration (Superdex Peptide PE, 300x7.5) isoliert und **29** konnte in einer Ausbeute von 74 % erhalten werden. Die geänderten Bedingungen der Isolierung (Reduktion, höhere Acetonitrilkonzentration) ergaben fast eine Verdopplung der Ausbeute nach der Reinigung des geschützten Ligationsproduktes **29** im Vergleich zur Isolierung von **25** (vgl. 5.2.9).

Für die Synthese der kompletten *RNase* 1-124 **30** mit einem GlcNAc am Asparagin 34 wurde das isolierte Produkt **29** mit einem 1.5-fachen Überschuss an Thioester *RNase* 1-25 **18** in Ligationspuffer 3 (6 M GdmCl, 0.1 M Na₂HPO₄, 2 mM EDTA, 30 mM TCEP, 0.2 M MPAA pH = 7.0) gelöst und für einen Tag unter anaeroben Bedingungen bei 25 °C inkubiert (Abbildung 84). Der Erfolg der Reaktion wurde nach 24 Stunden durch eine LC-MS-Analyse und eine SDS-PAGE kontrolliert, wobei alle zu untersuchenden Proben unter anaeroben Bedingungen entnommen wurden, um eine Oxidation des Zielproteins zu verhindern.

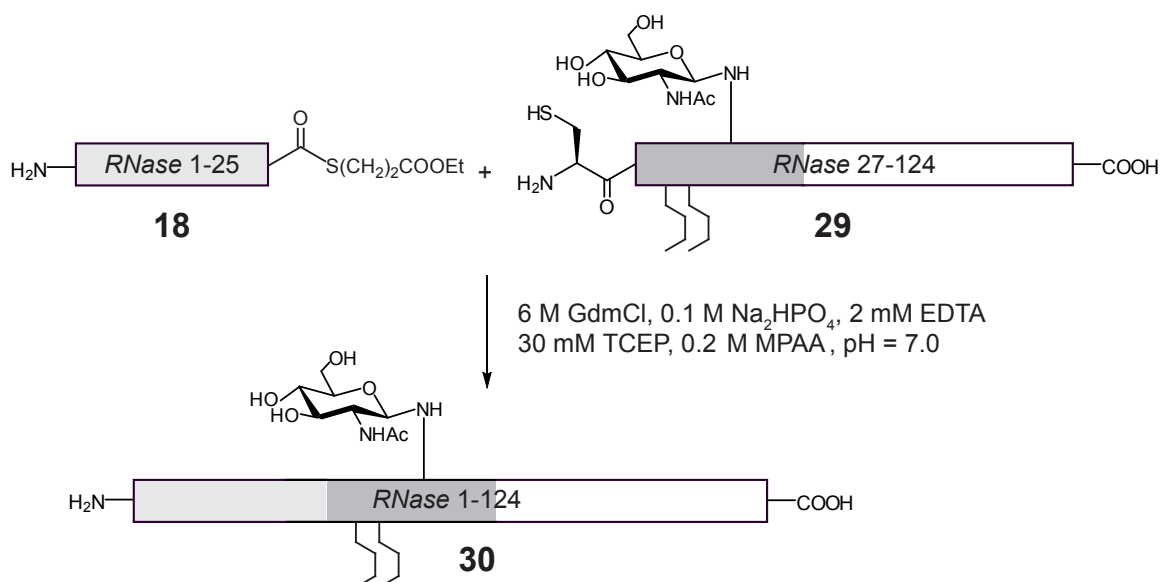


Abbildung 84. Ligation zu *RNase* 1-124, Asn34GlcNAc, [Met30Nle, Met31Nle] **30**

Für die Isolierung von **30** wurde die Ligationslösung zunächst mit frischem TCEP bei einem pH-Wert von 6.0 reduziert und anschließend mit 30 % igem Acetonitril/

0.1 % Ameisensäure eine Endkonzentration von 25 % an CH_3CN eingestellt. Die Reinigung erfolgte durch Gelfiltration. Nach Eindampfen der gesammelten Fraktionen konnte eine Ausbeute von 0.11 mg erhalten werden. Die Reinheit des Produktes wurde durch eine LC-MS-Analyse kontrolliert. Als Hauptpeak eluierte bei 21.53 min das Produkt **30**, wobei Thioester **18** und seine MPAA-Form **18c** getrennt zu erkennen waren.

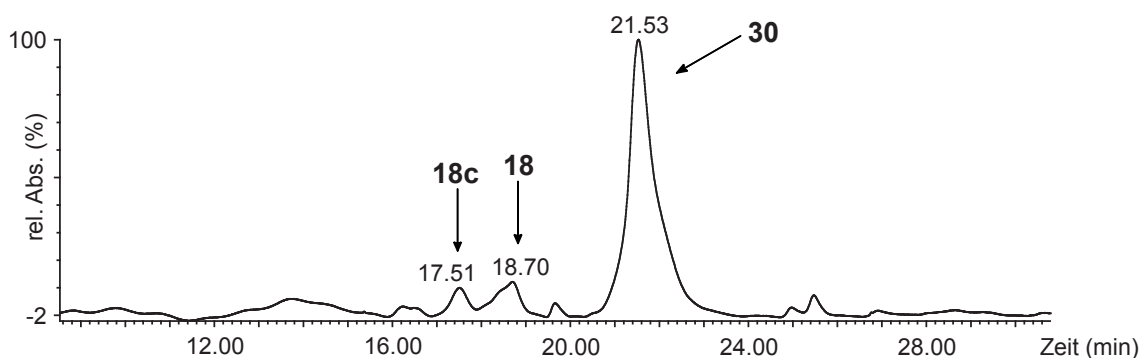


Abbildung 85. HPLC-Profil der isolierten RNase 1-124, Asn34GlcNAc, [Met30Nle, Met31Nle] **30**

Das korrespondierende ESI-MS-Spektrum bestätigte die erwartete Masse von 13857 Da (Abbildung 86). Zu sehen sind die mehrfach geladenen Wasserstoffaddukte.

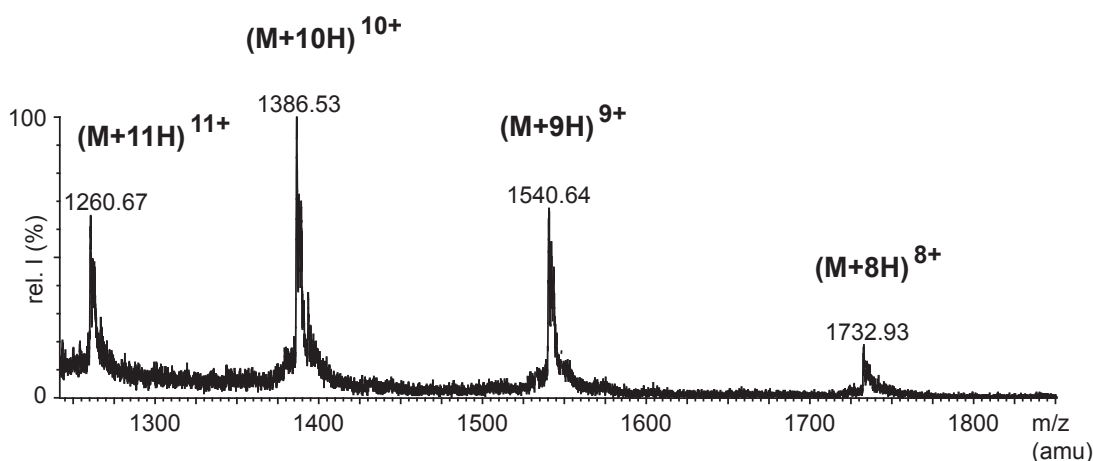


Abbildung 86. ESI-MS von RNase 1-124, Asn34GlcNAc, [Met30Nle, Met31Nle] **30**

Die Untersuchung der Ligationen mittels SDS-PAGE bestätigte die Synthese von **28** und **30**. In Abbildung 86 sind drei Banden mit steigendem Molekulargewicht im Bereich 9.2, 11.2 und 13.8 kDa zu erkennen. Das Monosaccharid GlcNAc beeinträchtigte das

Migrationsverhalten der Ligationsprodukte nur geringfügig, so dass eine Proportionalität zur Proteingröße gewährleistet ist.

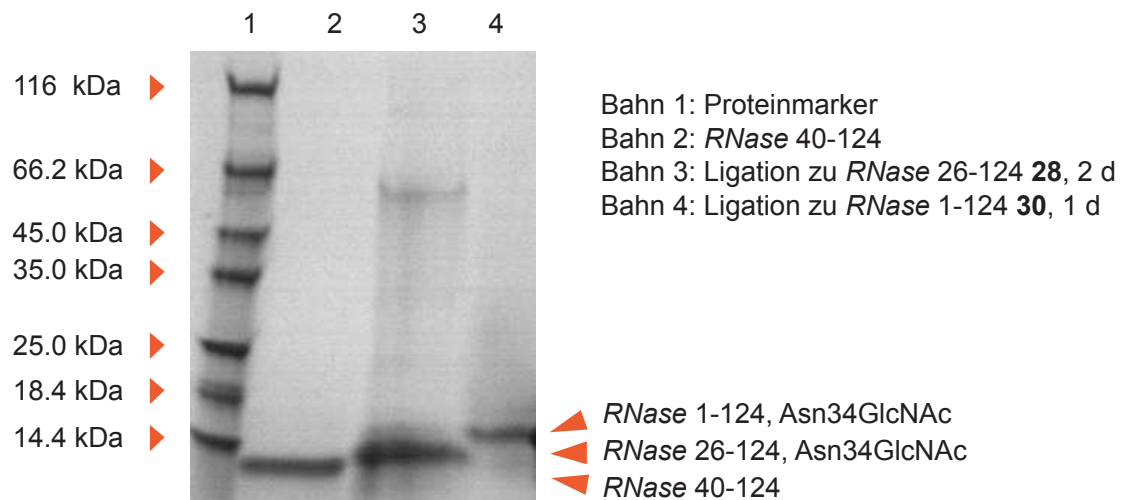


Abbildung 87. SDS-PAGE der Ligation zu *RNase* Thz-26-124 **28** und *RNase* 1-124 **30**, Asn34GlcNAc, [Met30Nle, Met31Nle]

Das isolierte Peptid **30** wurde anschließend denaturiert, rückgefaltet und auf enzymatische Aktivität untersucht (vgl. 5.3).

5.2.11. Synthese von *RNase* 1-124, Asn34Nona, [Met30Nle, Met31Nle]

Nach der erfolgreichen Synthese vollständiger *RNase* mit einem Monosaccharid sollte mit der gleichen Strategie eine Form der bovinen *Ribonuclease* 1-124 mit einem komplexen N-Glycan am Asparagin 34 gewonnen werden. Dazu wurden in einer ersten Ligation annähernd äquimolare Mengen des Glycopeptidthioesters *RNase* Thz-26-39 **31** mit dem vollständig SCE-geschützten Peptid *RNase* 40-124 **3** in Ligationspuffer 2 (6 M GdmCl, 0.1 M Na₂HPO₄, 30 mM TCEP, 2 mM EDTA, pH = 7.0) gelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 % Thiophenol gestartet und zwei Tage unter anaeroben Bedingungen bei 25 °C inkubiert. Der Thioester **31** enthielt neben dem Oligosaccharid an Asn34 Norleucin an den Positionen 30 und 31 (vgl. 5.2.10).

Nach zwei Tagen wurde die Ligation mittels LC-MS analysiert. Der Hauptpeak bei 21.54 min konnte dem Peptid *RNase* Thz-26-124 **32** mit Nonasaccharid zugeordnet werden. Sowohl Thioester **31**, als auch Cysteinpeptid **3** waren nahezu vollständig umgesetzt, wobei der Phenylthioester **31a** noch in Spuren detektierbar war (vgl. Abbildung 90a).

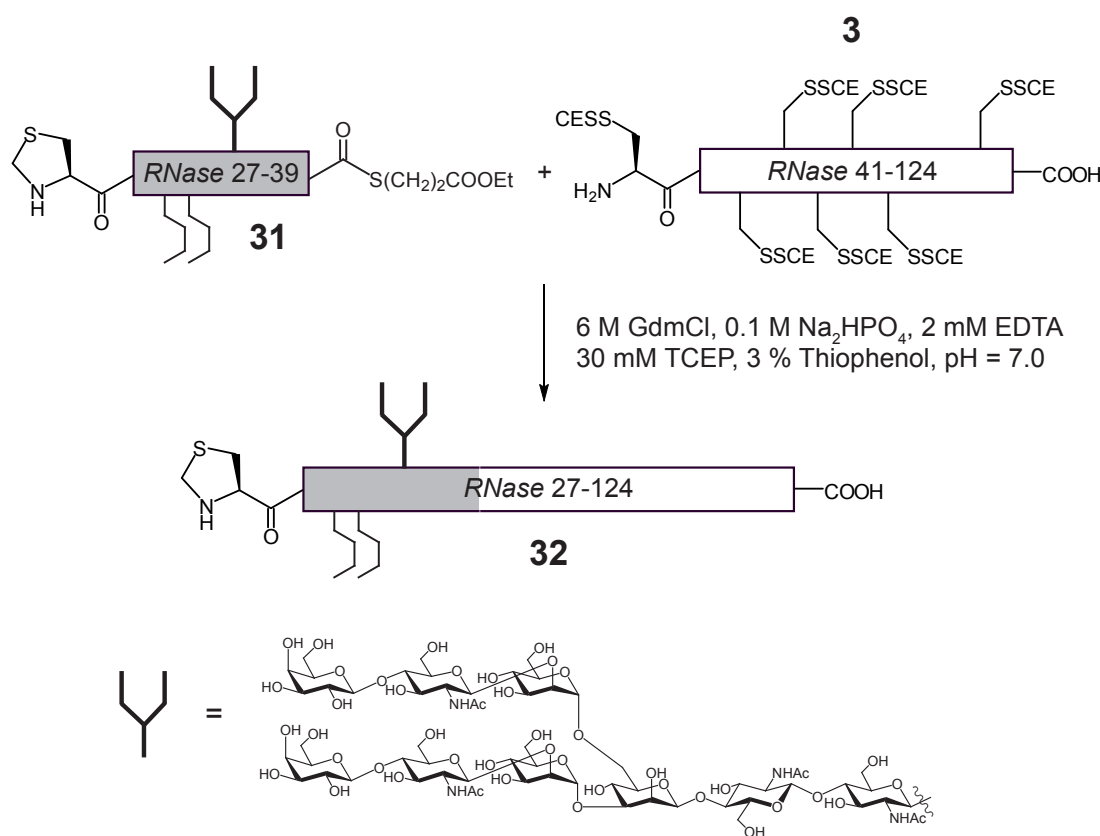


Abbildung 88. Ligation zu *RNase* Thz-26-124, Asn34Nona, [Met30Nle, Met31Nle] **32**

Nach der Ligation wurde der Thiazolidinring durch Behandlung mit 0.1 M Methoxyamin geöffnet (Abbildung 89). Sämtliche Schritte wie Probenentnahme für die LC-MS, Zugabe des Methoxyamins sowie pH-Wert-Justierung erfolgten dabei unter anaeroben Bedingungen.

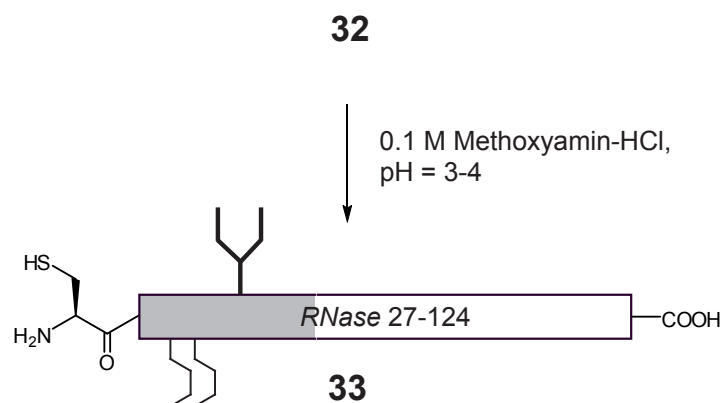


Abbildung 89. Thiazolidinöffnung zu RNase 26-124, Asn34Nona, [Met30Nle, Met31Nle] **33**

Nach einer Inkubationszeit von 21 h wurde die Öffnung des Thiazolidins durch LC-MS bestätigt. Nach der Abspaltung wurde der Ansatz zunächst mit TCEP in Ligationspuffer bei einem pH-Wert von 6.0 reduziert und mit 30 % igem Acetonitril/ 0.1 % Ameisensäure auf eine Endkonzentration von 25 % Acetonitril eingestellt.

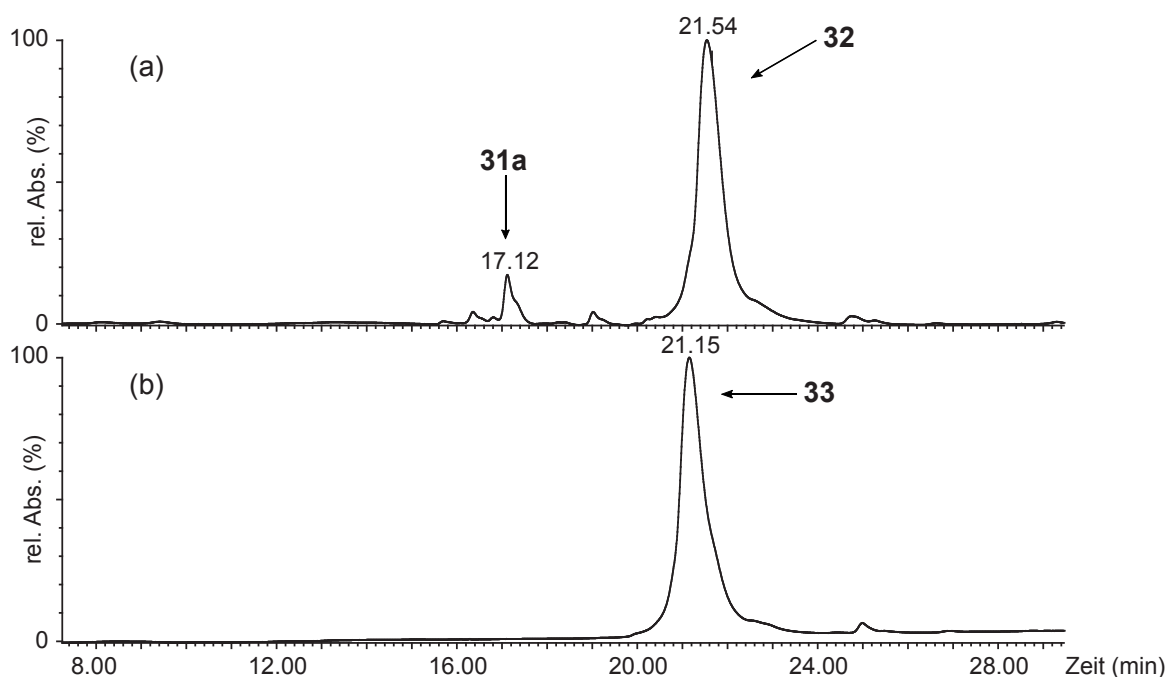


Abbildung 90. HPLC-Profil der Ligation zu **32** (a) und Thiazolinöffnung zu **33**

Anschliessend wurde das Protein durch Gelfiltration (Superdex Peptide PE, 300x7.5) isoliert. Dabei konnte **33** in einer Ausbeute von 48 % erhalten werden. Die Reinheit des entschützten Ligationsproduktes *RNase* 26-124 **33** wurde durch eine LC-MS-Analyse bestätigt. In Abbildung 90 b ist das RP-HPLC-Profil des gereinigten Glycopeptids **33** nach der Gelfiltration dargestellt. Der Vergleich der Retentionszeiten mit dem geschützten Ligationsprodukt **32** (Abbildung 90 a) zeigte für **33** eine frühere Elutionszeit von 0.4 min. Die korrespondierenden ESI-MS-Spektren der beiden Proteine **32** und **33** zeigten die erwartete Massendifferenz von 12 Da. Dargestellt sind die sechs- bis zehnfach geladenen Wasserstoffaddukte (Abbildung 91). Die daraus resultierenden Massen stimmen gut mit den berechneten Molekulargewichten von 12594 Da für **32** bzw. 12582 Da für **33** überein.

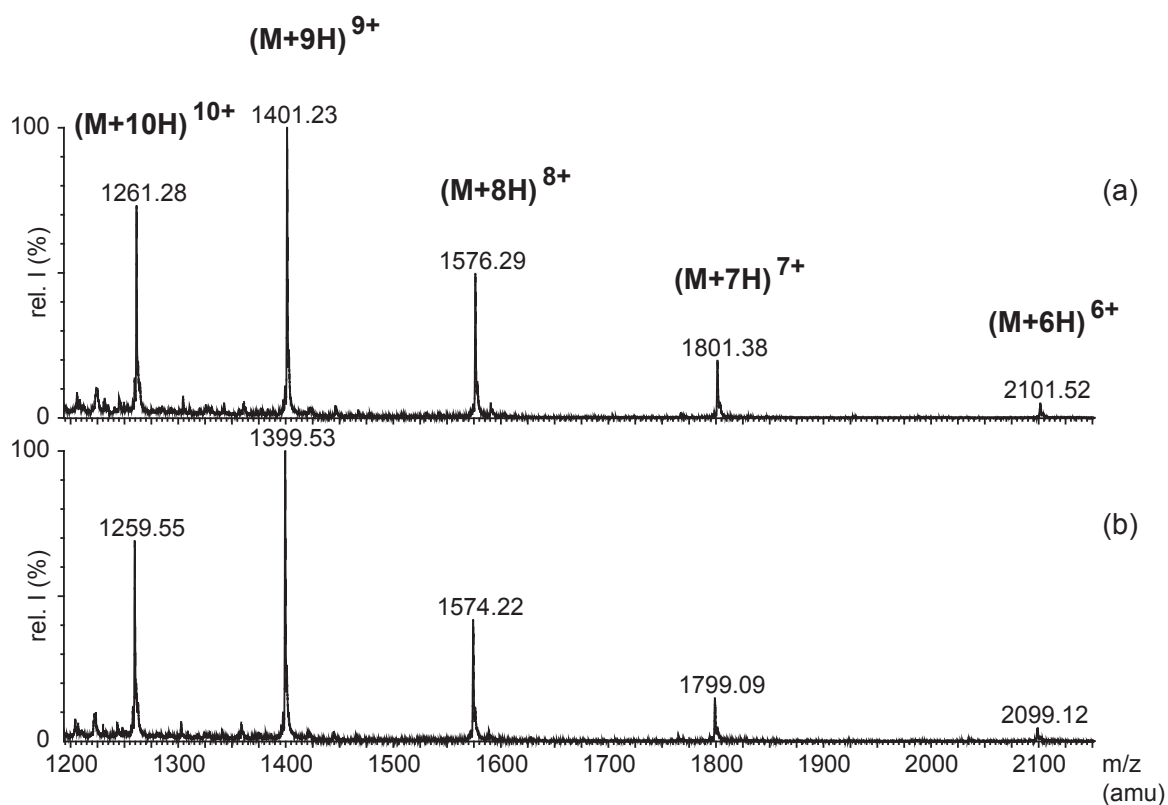


Abbildung 91. ESI-MS-Spektrum von **32** (a) und **33** (b)

Für die Synthese der kompletten *RNase* 1-124 mit komplexem N-Glycan am Asparagin 34 wurde das isolierte Glycopeptid **33** mit 1.2 Äquivalenten an Thioester *RNase* 1-25 **18** in Ligationspuffer 3 (6 M GdmCl, 0.1 M Na_2HPO_4 , 2 mM EDTA, 30 mM TCEP, 0.2 M MPAA, pH = 7.0) gelöst und für einen Tag unter anaeroben Bedingungen bei 25 °C inkubiert (Abbildung 92).

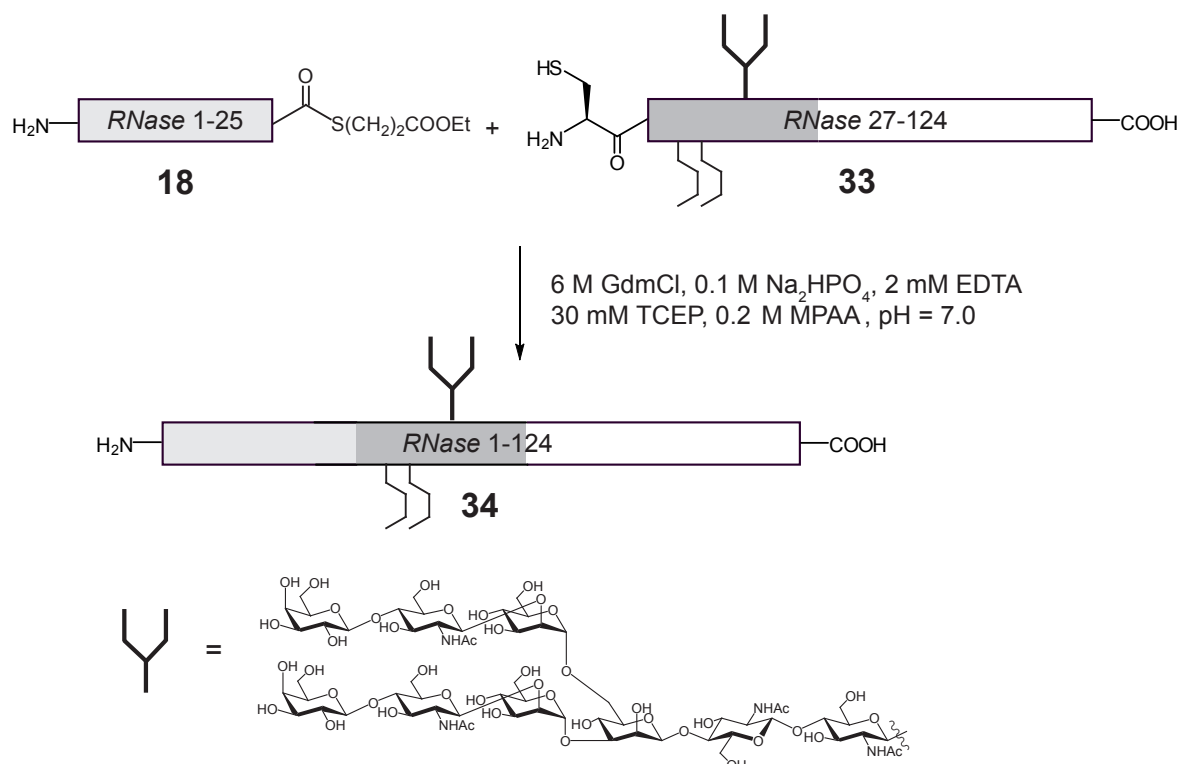


Abbildung 92. Ligation zu RNase 1-124, Asn34Nona, [Met30Nle, Met31Nle] **34**

Die Reaktion wurde nach 24 Stunden durch LC-MS und mittels SDS-PAGE kontrolliert, wobei alle zu untersuchenden Proben unter anaeroben Bedingungen entnommen wurden. Die LC-MS-Analyse bestätigte die erfolgreiche Ligation zur kompletten bovinen *Ribonuclease* 1-124 **34** mit Nonasaccharid und Norleucin an Positionen 30 und 31. Dabei konnte restliche RNase 26-124 **33** nicht mehr nachgewiesen werden (Abbildung 93). Das korrespondierende ESI-MS-Spektrum bestätigte die berechnete Masse von 15277 Da. Der im Überschuss eingesetzte Thioester **18** lag sowohl in seiner ursprünglichen Form, als auch als Thioester von MPAA **18c** vor.

Die Untersuchung der Ligationen mittels SDS-PAGE bestätigte die Synthese von **32** und **34** (Abbildung 94). Da beide Ligationsprodukte ein komplexes N-Glycan tragen, weicht das Migrationsverhalten von unglycosylierten Proteinen ab. Die beiden neu entstandenen Banden liegen bei höherem Molekulargewicht, als dies normalerweise (12.6 kDa bzw. 15.3 kDa) der Fall wäre.

Somit konnte die Methode der sequentiellen Ligationen mit einer Isolierung des entschützten Ligationsproduktes zur Synthese eines Glycoproteins mit komplexem N-Glycan erfolgreich angewandt werden.

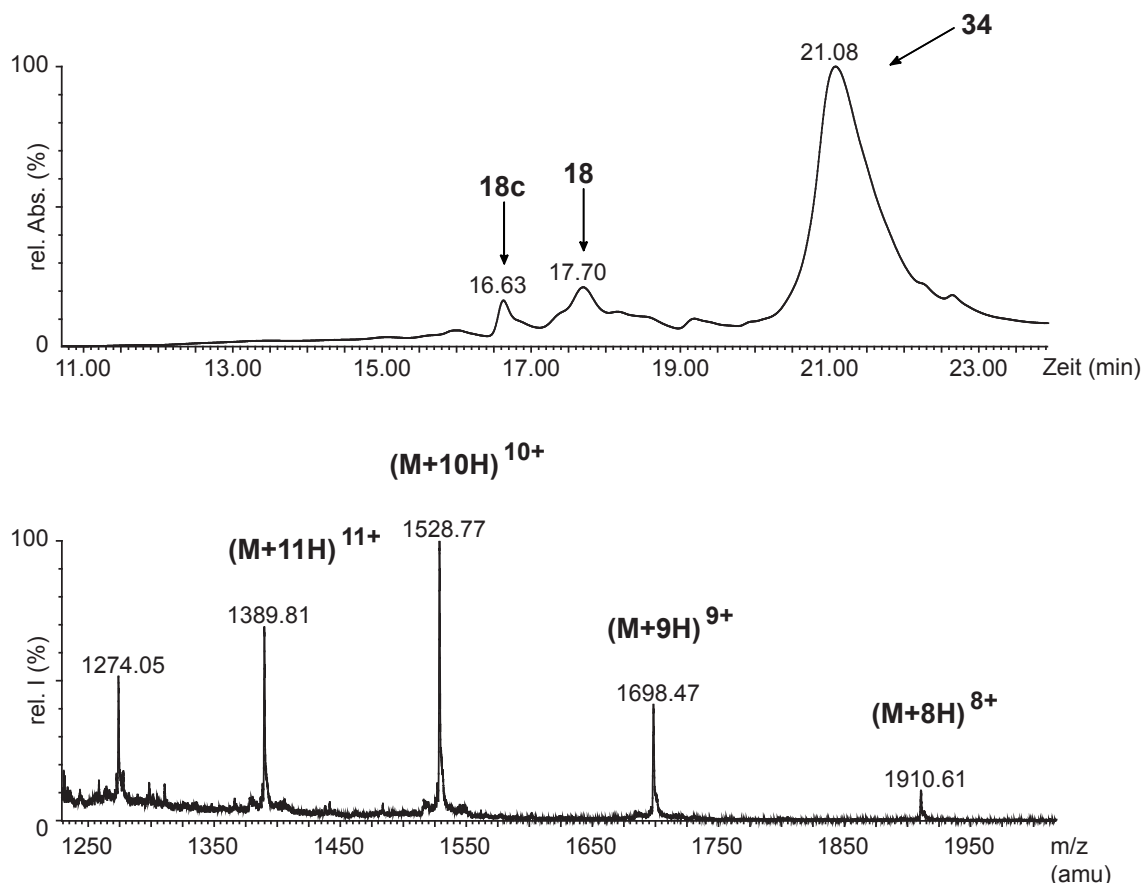


Abbildung 93. LC-MS-Analyse der Ligation zu RNase 1-124, Asn34Nona, [Met30Nle, Met31Nle] **34**

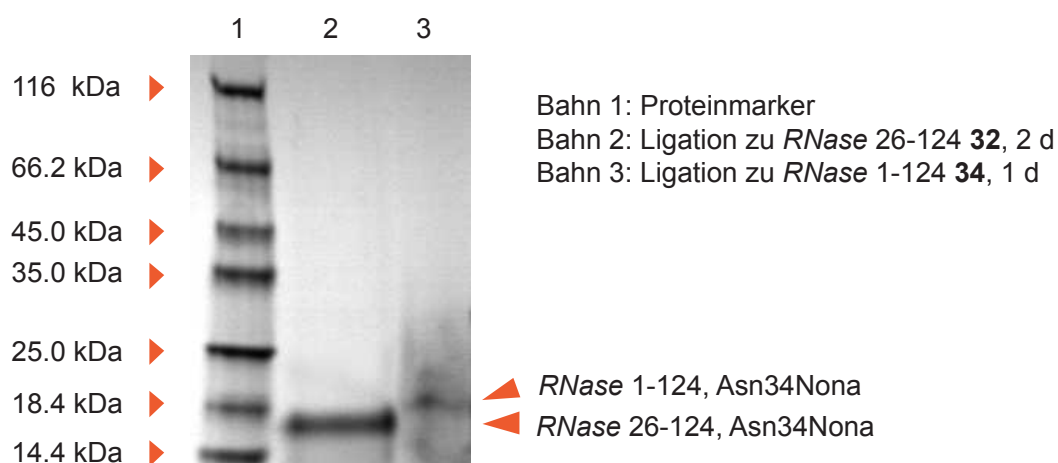


Abbildung 94. SDS-PAGE der Ligation zu RNase Thz-26-124, Asn34Nona **32** und RNase 1-124, Asn34Nona **34**

Die vollständige RNase 1-124, Asn34Nona, [Met30Nle, Met31Nle] **34** wurde im Anschluss direkt aus der Ligationlösung rückgefaltet und analysiert (vgl. 4.2.1.10 und 4.2.1.11).

5.3. Rückfaltung und Aktivitätstest der synthetischen Enzyme

Die Messung der enzymatischen Aktivität von *Ribonuclease* bietet eine sehr sensitive Methode zum Nachweis von nativen Proteinstrukturen.^[152] Dazu wurden die gewonnenen Varianten der bovinen *Ribonuclease* nach ihrer Synthese rückgefaltet. Die Proteine **5**, **14**, **26** und **30** wurden zunächst aus der jeweiligen Ligationsmischung ohne vorherige Rückfaltung isoliert. Da es dabei durch die Einwirkung von Luftsauerstoff zu einer Oxidation der Cysteine kommen konnte, wurden die gereinigten Produkte zunächst unter denaturierenden Bedingungen frisch reduziert. Dies erfolgte durch eine zweistündige Inkubation in einem 6 M Guanidinpuffer, der 0.2 M GSH als Reduktionsmittel enthielt. Zusätzlich wurde dem Puffer 2 mM des Chelatbildners EDTA zugegeben, um eine metallkatalysierte Reoxidation der Thiole durch Luftsauerstoff zu verhindern. Im Anschluss erfolgte eine 60-fache Verdünnung mit Rückfaltungspuffer (0.1 M Tris, 2 mM EDTA, 0.3 mM GSSG, pH = 8.5). Daraus resultierte ein oxidatives Regenerationssystem („oxido-shuffling“) aus oxidiertem GSSG und reduziertem GSH in einem Verhältniss von etwa 1:10.^[153] Diese Mischung gewährleistete die Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken durch schnelles „reshuffling“ falscher Disulfide und erhöhte somit die Geschwindigkeit und die Ausbeute der oxidativen Rückfaltung.

Die Bestimmung der Aktivität wurde mit Hilfe des Enzymassays von Crook *et al.* durchgeführt.^[101] Neben der Spaltung von RNA-Strängen können als Substrate 2',3'-cyclische Nucleosidphosphodiester verwendet werden, die das Produkt der Transphosphorylierung von RNA durch *RNase* sind.^[154] Diese cyclischen Intermediate werden durch Hydrolyse zum 3'-Phosphomonoester umgewandelt.^[155] Bei Verwendung von cyclischem 2',3'-Cytidinmonophosphat kann die durch die Hydrolyse hervorgerufene Absorptionsänderung bei 292 nm gemessen und somit zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität verwendet werden.

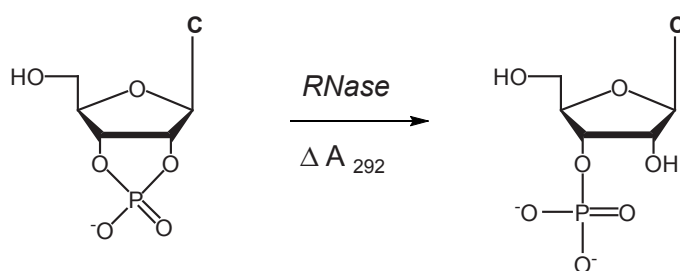


Abbildung 95. Hydrolyse von cyclischem 2',3'-Cytidinmonophosphat durch *RNase*

Nach einem Tag wurden aus den Rückfaltungsmischungen von Met-*RNase* 1-124 **5**, Met-*RNase* 1-124, (SCE)₈ **14**, *RNase* 1-124, [Asn34Pra] **26** und *RNase* 1-124, Asn34GlcNAc, [Met30Nle, Met31Nle] **30** jeweils 100 µl entnommen, zu 1600 µl 50 mM Natriumcacodylat mit 0.3 mg/ml cyclischem 2',3'-CMP gegeben und bei 25 °C für drei Minuten die Absorptionsänderung bei 292 nm verfolgt.

Die Absorptionsänderungen der durch rückgefaltetes Peptid **5** bzw. **14** hervorgerufenen Hydrolyse von CMP bestätigte die native Struktur der beiden Enzyme. Im Vergleich zur Referenz, die kein Enzym enthielt, ist eine Zunahme der Absorption bei 292 nm zu erkennen. Der Einfluss der gemischten Disulfide von **14** wurde nicht untersucht, da diese durch Reduktion vor der Rückfaltung bereits entfernt wurden.

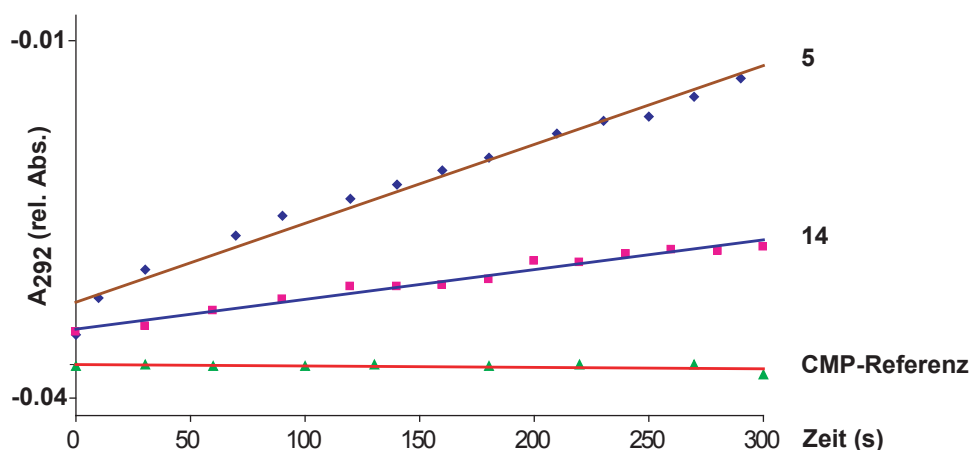


Abbildung 96. Aktivitätstest nach der Rückfaltung von **5** und **14**

Die Aktivität und damit eine native Proteinstruktur konnte nach einem Tag auch bei der *RNase* 1-124, [Asn34Pra] **26** und *RNase* 1-124, Asn34GlcNAc, [Met30Nle, Met31Nle] **30** nachgewiesen werden (Abbildung 97 und 98).

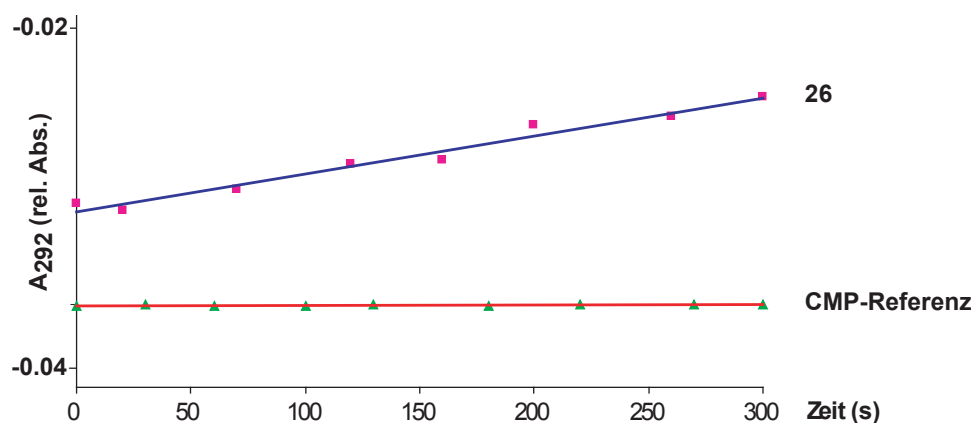


Abbildung 97. Aktivitätstest nach der Rückfaltung von **26**

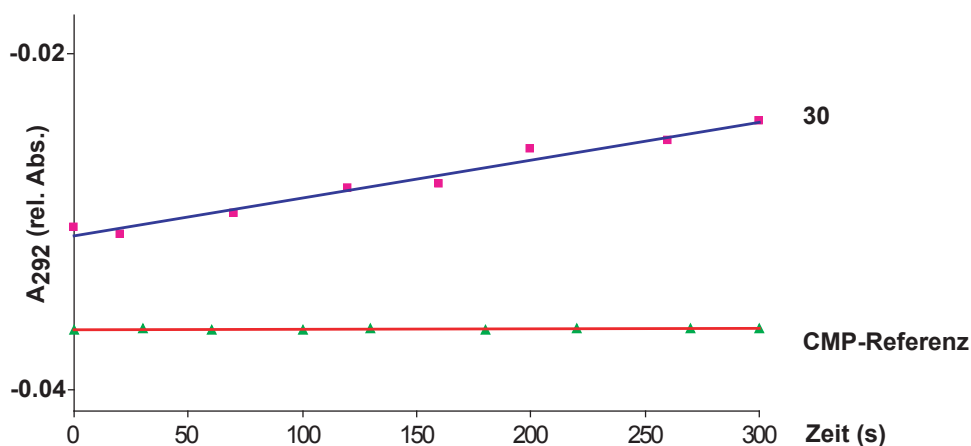


Abbildung 98. Aktivitätstest nach der Rückfaltung von **30**

Für die Rückfaltung der *RNase* 1-124 mit komplexem N-Glycan wurde die Ligationslösung zu **34** nach einem Tag Reaktionszeit direkt mit Rückfaltungspuffer (0.1 M Tris, 2 mM EDTA, 0.3 mM GSSG, pH=7.7) verdünnt.

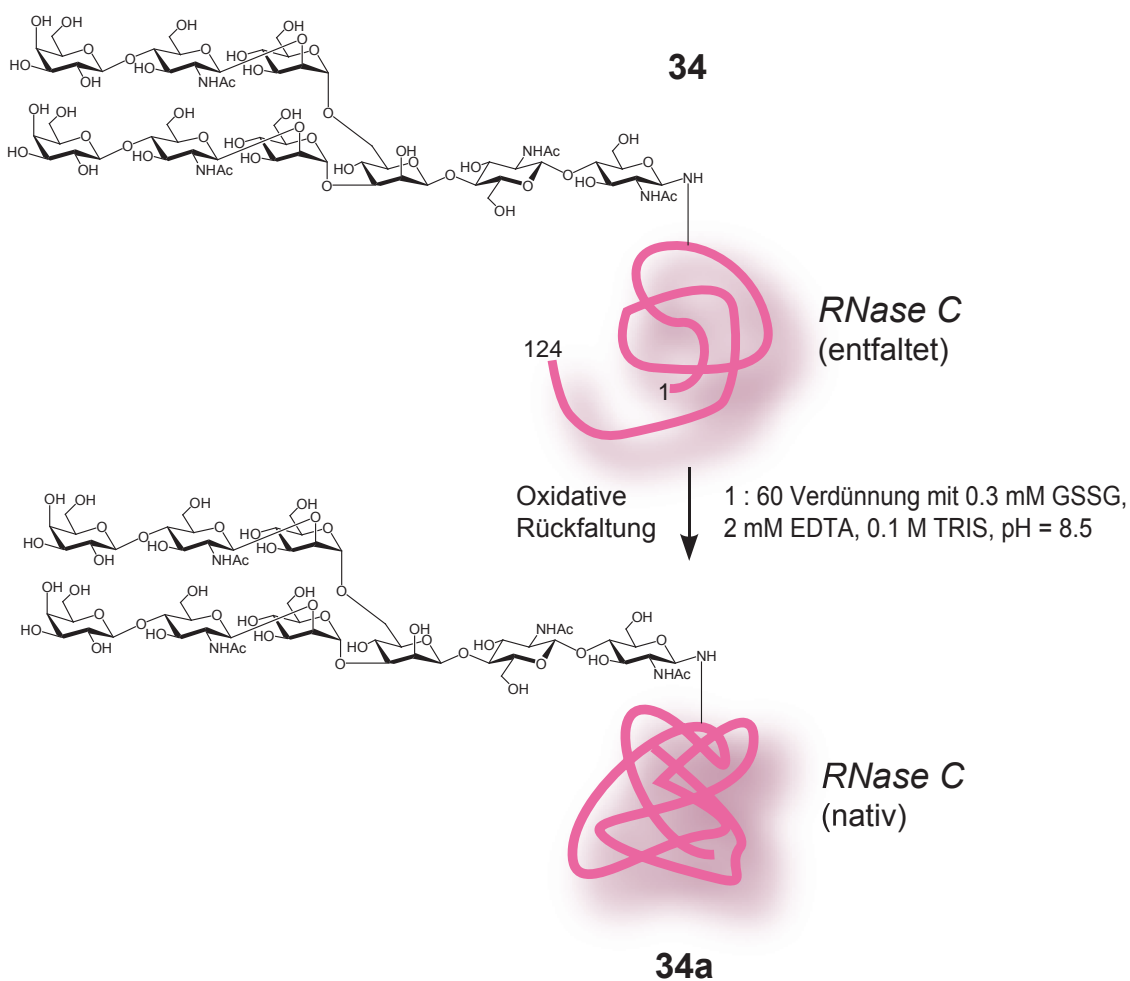


Abbildung 99. Rückfaltung zur nativen *RNase* 1-124, Asn34Nona **34**, [Met30Nle, Met31Nle]

Da der Ligationspuffer 0.2 M MPAA als Reduktionsmittel enthielt, wurde durch 60-fache Verdünnung mit 0.3 mM GSSG eine oxidative Rückfaltungslösung mit einem Verhältnis von Thiol zu Disulfid von etwa 10:1 erzeugt. Da MPAA auf Grund seines niedrigeren pK_a -Wertes (6.6) im Vergleich zu Glutathion ($pK_a=8.7$) eine besseres Nucleophil und eine bessere Abgangsgruppe ist,^[156] sollte die oxidative Rückfaltung unter Bildung der korrekten Disulfide schneller und quantitativer verlaufen. Da der Enzymassay direkt aus der Rückfaltungslösung auf Grund der hohen Hintergrundabsorption von MPAA nicht durchgeführt werden konnte, erfolgte die Rückfaltung über einen Zeitraum von vier Tagen, um eine möglichst vollständige Renaturierung zu erreichen. Vor der Reinigung wurde die Lösung mit 90 % Acetonitril auf eine CH_3CN -Konzentration von 25 % gebracht und das native Protein **34a** durch Gelfiltration (Superdex Peptide PE, 300x7.5) mit 25 % Acetonitril/Wasser/0.1 % Ameisensäure gereinigt. Es konnten 71 % **34a** erhalten werden. Zur Bestimmung der Aktivität wurden vom isolierten Produkt 0.05 mg in 100 μ l 50 mM Natriumcacodylatpuffer gelöst und zu 1600 μ l Natriumcacodylatpuffer mit 0.3 mg/ml cyclischem 2',3'-CMP gegeben. Anschließend wurde über drei Minuten die Absorptionsänderung bei 292 nm gemessen. Abbildung 100 zeigt die zunehmende Absorption, hervorgerufen durch die von nativer **34a** katalysierten Hydrolyse von cyclischem CMP. Als Referenz wurde über die gleiche Zeit die Absorptionsänderung ohne Enzym gemessen.

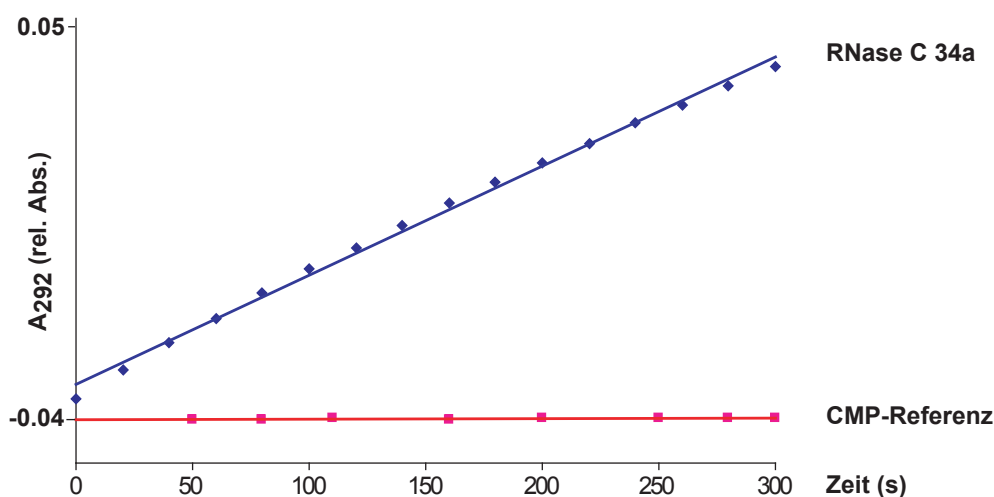


Abbildung 100. Aktivitätstest von **34a**

Die katalytische Aktivität wurde mit kommerzieller *RNase A* verglichen. Es konnte ein k_{cat}/K_m -Wert für die synthetische *RNase C 34a* von $9.6 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden (Literatur: $5.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für *RNase A*, $1.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für *RNase B*).^[157,97]

Neben dem Nachweis der katalytischen Aktivität konnte die erfolgreiche Rückfaltung auch durch eine LC-MS-Analyse bestätigt werden. Der Vergleich der beiden ESI-MS-Spektren von **34** und **34a** zeigte ein um 8 Da leichteres Molekulargewicht von **34a** (Abbildung 101). Dieses resultiert aus dem Verlust von acht Wasserstoffatomen bei der oxidativen Rückfaltung unter Bildung von vier Disulfiden.

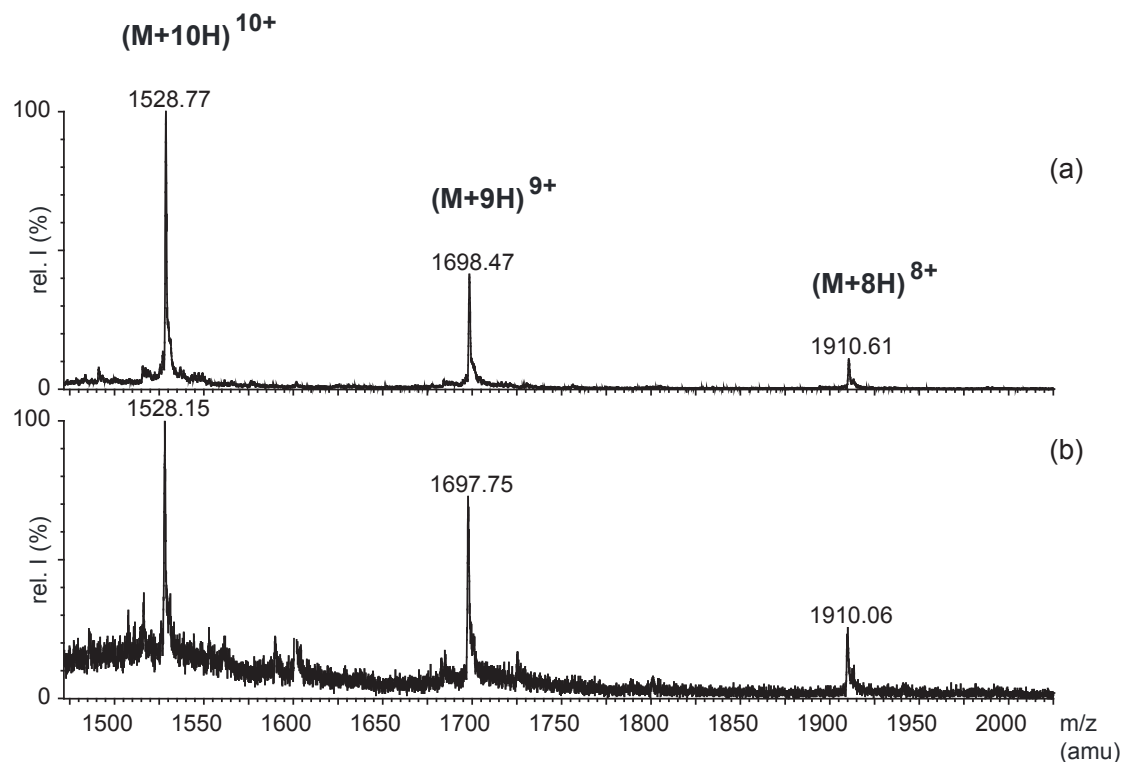


Abbildung 101. ESI-MS-Spektrum von reduzierter RNase C I-124 **34** (a) und nativer RNase C I-124 **34a** (b)

In dieser Arbeit konnte mit Hilfe des Inteinsystems die Synthese von Peptiden mit N-terminalem Cystein etabliert werden. Da cysteinreiche Fragmente auf Grund ihrer Oxidationsempfindlichkeit oftmals nicht stabil bzw. schwer handhabbar sind, wurde eine Methode entwickelt, um Peptide mit N-terminalem Cystein zu gewinnen, deren Cysteine als Disulfide geschützt waren. Diese Fragmente konnten mit C-terminalen Thioestern durch native chemische Ligation zur Reaktion gebracht werden. Dabei konnten die Ligationsbedingungen optimiert werden, so dass Ligationsreaktionen, Analytik und Ausbeuten reproduzierbar wurden. Ständiger Sauerstoffausschluss (anaerobes Zelt) und reduzierende Bedingungen (TCEP) waren dabei die wichtigsten Kriterien. Durch sequentielle native chemische Ligationen konnten verschiedene Varianten der bovinen *Ribonuclease* erhalten werden. Die Isolierung von Ligationsprodukten gelang am Besten

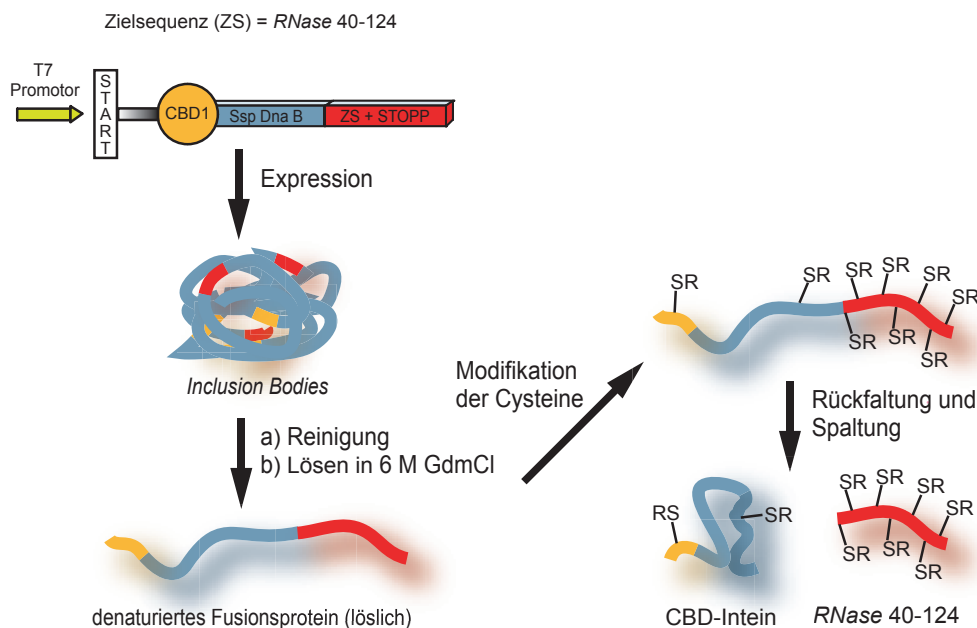
nach Reduktion mit TCEP und anschließendem Ansäuern (0.1 % Ameisensäure) bei einer Acetonitrilkonzentration von 25 %.

Es konnte die Synthese eines homogenen Glycoproteins mit komplexem N-Glycan und nativer Struktur realisiert und durch einen Enzymassay bestätigt werden. Die gewonnenen Erkenntnisse und Methoden sollten auf andere Glycoproteine übertragbar sein und damit in Zukunft die Synthese von weiteren uniformen Glycoproteinen ermöglichen.

6. Zusammenfassung

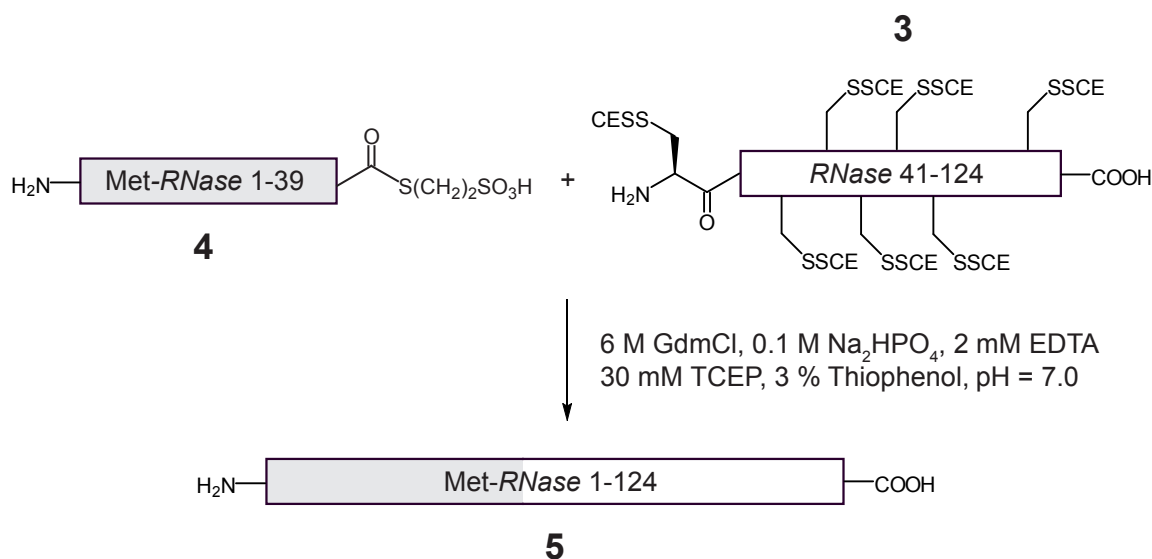
Die Bereitstellung von ausreichenden Mengen an einheitlichen Glycoproteinen ist bis heute auf Grund der Mikroheterogenität und der damit verbundenen Probleme bei der Isolierung aus natürlichen Quellen eine ungelöste Aufgabe. Nur mit homogenem Material sind jedoch detaillierte Untersuchungen auf dem Gebiet der Struktur-Wirkungsbeziehung möglich, was beispielsweise zur Optimierung von therapeutischen Glycoproteinen verwendet werden kann. Deshalb sollten in dieser Arbeit Methoden zur Totalsynthese von uniformen Glycoproteinen etabliert werden. Dazu sollte die chemoselektive Reaktion von Glycopeptidthioestern und molekularbiologisch gewonnenen Fragmenten mit N-terminalem Cystein über die native chemische Ligation (NCL) ausgenutzt werden. Diese Methode sollte am Beispiel des gut untersuchten Modellproteins bovine *Ribonuclease* 1-124 entwickelt und optimiert werden. Zur Synthese verschiedener Formen der *RNase* durch NCL wurde das Cystein 40 als Ligationsstelle gewählt. Das Fragment 40-124 **B** mit N-terminalem Cystein sollte mit dem Thioester Met-*RNase* 1-39 **A** bzw. kürzeren glycosylierten Varianten über sequentielle Ligationsschritte zur vollständigen *RNase* ligiert werden.

Zur Gewinnung des N-terminalen Cysteinfragmentes 40-124 **B** der *RNase* wurde das pTWIN-Expressionssystem verwendet, das die induzierbare, autokatalytische Spaltung von Inteinen ausnutzt. Durch Expression des entsprechenden Plasmids pTWIN^{cp1} in *E. coli* konnte das Fusionsprotein in Form von unlöslichen *Inclusion Bodies* erhalten werden.



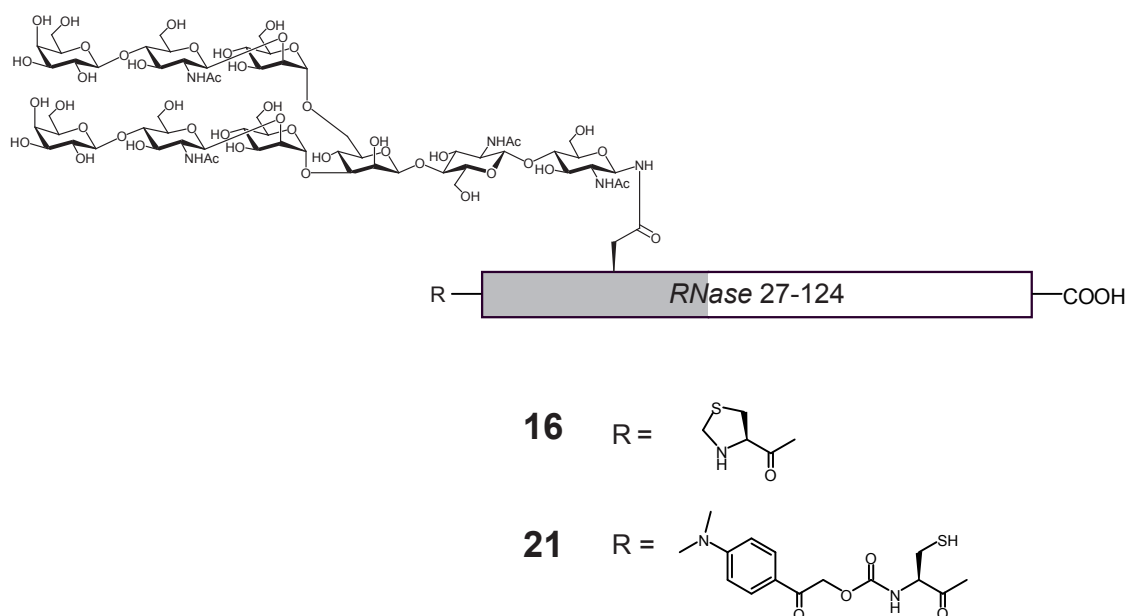
Diese wurden gereinigt, solubilisiert und unter optimierten Bedingungen rückgefaltet. Trotz einer fast vollständigen Inteinspaltung konnte das stark oxidationsempfindliche und möglicherweise unlösliche Zilopeptid *RNase* 40-124 **B** nicht isoliert werden. Deshalb wurden die sieben Cysteine des Fragmentes vor der Rückfaltung und Inteinspaltung durch die Ausbildung gemischter Disulfide geschützt. Die Reaktion mit GSSG oder 3,3'-Dithiodipropionsäure ergab eine Mischung von Peptiden mit einer ungeraden Anzahl (1, 3, 5, 7) von modifizierten Cysteinen. Die vollständige Reaktion aller Cysteine gelang mit 2-Carboxyethyl-methanthiosulfonat, allerdings wurde die Spaltungseffizienz des Inteins dadurch reduziert. Nach Reinigung mittels RP-HPLC konnte das 7-fach geschützte und nicht mehr oxidationsempfindliche Fragment *RNase* 40-124 **3** in einer Ausbeute von bis zu 3.5 mg pro Liter LB-Medium erhalten werden.

Die Ligationsfähigkeit der als Disulfid modifizierten Fragmente **1** und **2** wurde zunächst mit dem Thioester Met-*RNase* 1-39 **4** bzw. dem glycosylierten Thioester *RNase* 30-39 **8** untersucht und die erfolgreiche Reaktion zu **5** und **9** mittels LC-MS bestätigt. Mit Hilfe des vollständig modifizierten Fragmentes *RNase* 40-124 **3** konnte unter optimierten Ligationsbedingungen die vollständige Met-*RNase* 1-124 **5** erhalten werden und nach einem Rückfaltungsschritt die enzymatische Aktivität durch Hydrolyse von cyclischem 2',3'-CMP nachgewiesen werden.



Die Synthese von glycosylierter *RNase* 1-124 sollte mit Hilfe einer sequentiellen Ligationsstrategie versucht werden. Dazu wurde das Fragment 1-39 in den Thioester 1-25 **F** und den glycosylierten Thioester 26-39 **D** geteilt, dessen N-terminales Cystein durch verschiedene Schutzgruppen maskiert wurde. Die Ligation zwischen dem vollständig SCE-geschützten Fragment *RNase* 40-124 **3** und den Thioestern Thz-26-39 **15** bzw.

Mapoc-26-39 **20** konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die Ligation zu **16** bzw. **21** und die anschließende Abspaltung der Schutzgruppen unter Freisetzung des N-terminalen Cysteins konnte mittels LC-MS nachgewiesen werden.



Zwar konnte nach der Öffnung des Thiazolidinringes mit Methoxyamin eine zweite Ligation mit dem Thioester *RNase* 1-25 **18** zur vollständigen *RNase* 1-124 **19** nachgewiesen werden, allerdings reagierte der größte Teil des Thioesters mit Methoxyamin zum unreaktiven Methoxyamid.

Deshalb wurde anstelle der sequentiellen Eintopf-Ligationsstrategie ein alternativer Syntheseweg mit einer Isolierung des Ligationsproduktes 26-124 nach der Methoxyaminentschützung angewandt. Diese Methode konnte mit den Ligationsprodukten *RNase* Thz-26-124 **24** und **28** etabliert werden. Die entschützten Produkte wurden mit einer Ausbeute von 44 % bzw. 74 % isoliert und mit dem Thioester **18** zu den *RNasen* **26** und **30** ligiert. Nach einer Rückfaltung der synthetischen Proteine konnte mit einem Enzymassay deren Aktivität nachgewiesen werden. Die gewonnenen Erkenntnisse konnten schließlich zur Synthese der kompletten *RNase* 1-124 **34** mit einem Nonasaccharid an Asn34 angewandt werden. Die Isolierung des entschützten Ligationsproduktes **33** aus der Reaktion von *RNase* 40-124 **3** mit dem Glycopeptidthioester *RNase* Thz-26-39 **31** gelang mit einer Ausbeute von 48 %. Das Produkt wurde mit **18** zur Reaktion gebracht und direkt zurückgefaltet. Nach Reinigung mittels Gelfiltration konnte das native Enzym **34a** in einer Ausbeute von 71 % gewonnen werden.

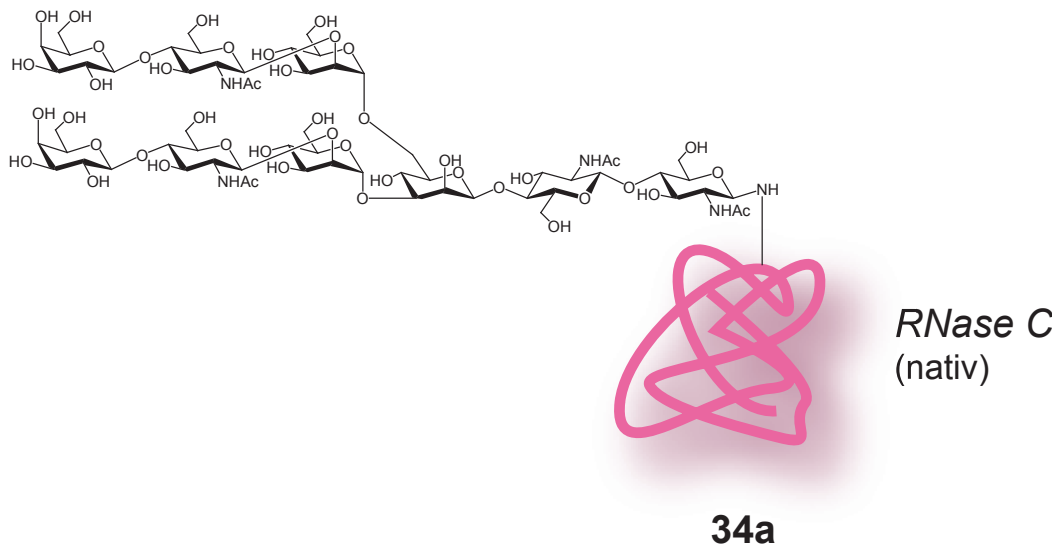


26 R = Pra

30 R = AsnGlcNAc; [Met30Nle, Met31Nle]

34 R = AsnGlcNAc₂Man₃GlcNAc₂Gal₂; [Met30Nle, Met31Nle]

Die *RNase*-Aktivität des synthetischen Glycoproteins **34a** wurde durch Vergleich mit der Aktivität von *RNase A* mit einem k_{cat}/K_m -Wert von $9.6 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt (*RNase A* = $5.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, *RNase B* = $1.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

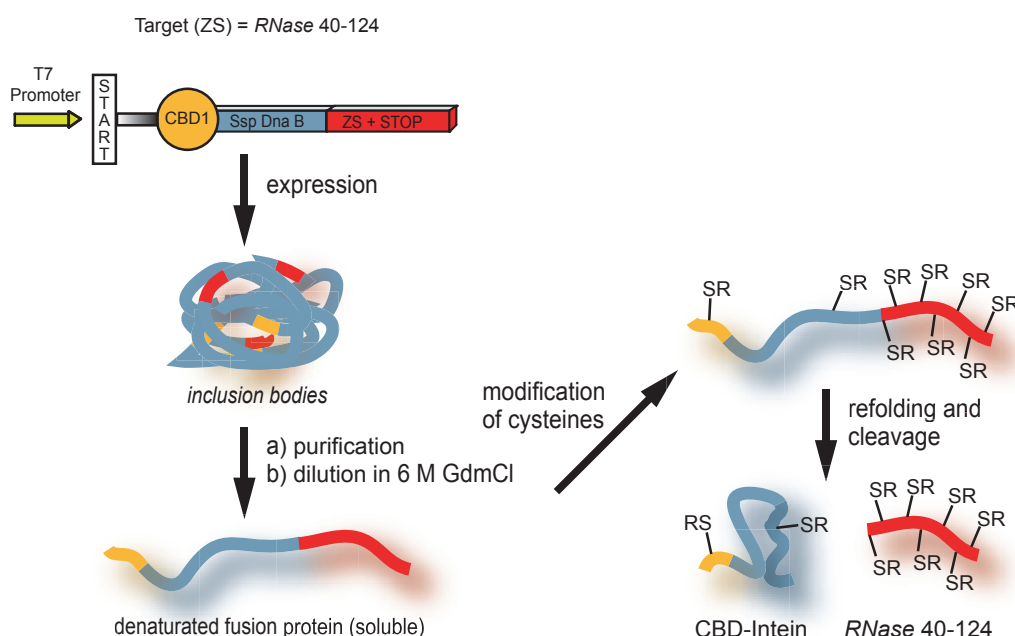


Durch die vorliegende Arbeit konnte eine reproduzierbare Methode zur molekularbiologischen Gewinnung von Fragmenten mit N-terminalem Cystein etabliert werden. Mit Hilfe eines rekombinanten *RNase*-Fragmentes und den entsprechenden Thioestern bzw. Glycopeptidthioestern konnte erstmals ein biologisch aktives, homogenes *RNase*-Glycoprotein mit komplexem N-Glycan erhalten werden. Diese Strategie sollte in Zukunft auf die Synthese von weiteren biochemisch und therapeutisch interessanten Proteinen übertragbar sein.

7. Summary

The production of sufficient amounts of homogeneous glycoproteins still remains a very difficult task. The microheterogeneity leads to a number of problems when trying to isolate single glycoforms from natural sources. Detailed structure activity relationships are only possible with uniform material, e.g. for optimizing the properties of therapeutic glycoproteins. Therefore methods aiming at the total synthesis of homogeneous glycoproteins should be investigated in this work. The chemoselective native chemical ligation was chosen to connect glycopeptide thioesters with fragments bearing an N-terminal cysteine. This strategy was optimized using bovine *ribonuclease* 1-124 as a model system. The cysteine at position 40 was selected as the ligation site for the different forms of *RNase*. With the fragment 40-124 **B** in hand, ligations with thioester Met-*RNase* 1-39 or other glycosylated thioesters were investigated.

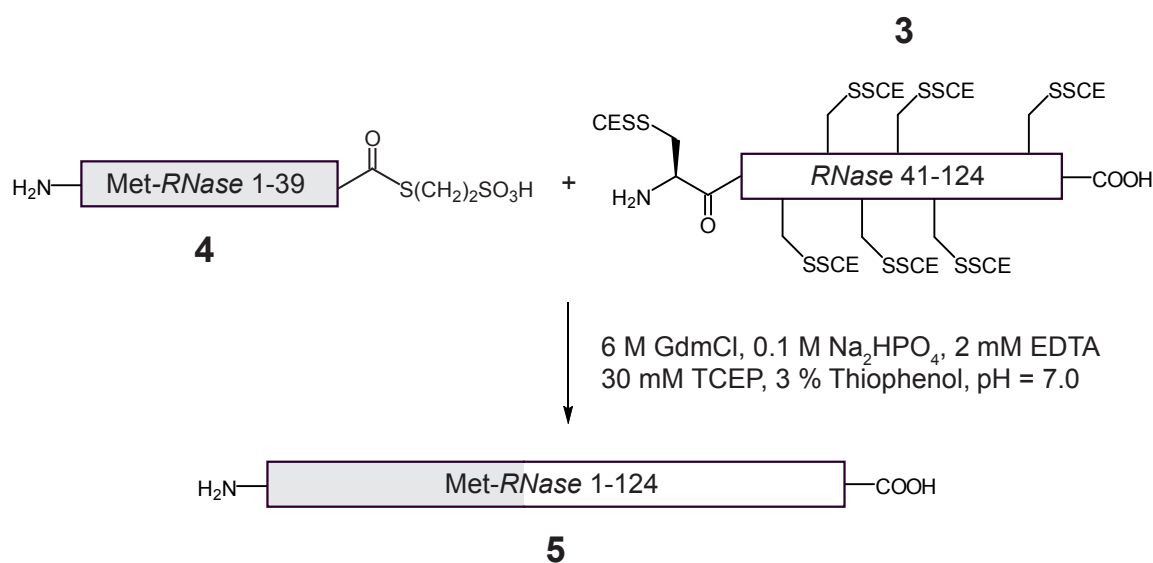
In order to obtain the N-terminal cysteine fragment *RNase* 40-124 **B** the pTWIN1 expression system was used, which contains self cleaving inteins. After overexpression of the plasmid pTWIN1^{cp1} the fusion protein was obtained as insoluble *inclusion bodies*.



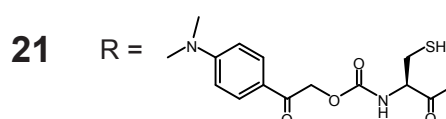
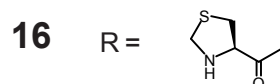
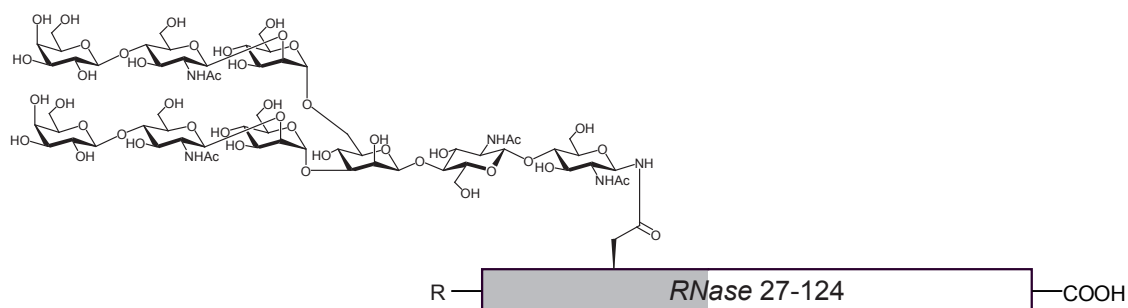
These were purified, dissolved and refolded using an optimized refolding buffer. Although a nearly complete intein cleavage was achieved, it was not possible to isolate the target peptide *RNase* 40-124 **B** due to its potential insolubility and sensitivity to oxidation.

Therefore the 7 cysteines of the peptide were modified as mixed disulfides prior to refolding and intein cleavage. The reaction with GSSG or 3,3'-dithio dipropionic acid gave a mixture of target peptides containing 1, 3, 5 and 7 mixed disulfides. Complete protection of the seven cysteines could be achieved using 2-carboxyethyl methane thiosulfonate, however, the cleavage efficiency of the intein was reduced. After purification by RP-HPLC the fully protected fragment *RNase* 40-124 **3** was obtained yielding up to 3.5 mg per liter of LB- medium.

Subsequently it was shown, that the disulfide modified fragments **1** and **2** were suitable for native chemical ligation with thioester Met-*RNase* 1-39 **4** and glycosylated thioester *RNase* 30-39 **8**. The formation of the ligation products **5** and **9** was confirmed by LC-MS analysis. With the fully protected peptide *RNase* 40-124 **3** it was possible to synthesize the complete Met-*RNase* 1-124 **5** under optimized ligation conditions. After refolding the *RNase* activity of the synthetic protein was determined by measuring the hydrolysis of cyclic 2',3'-CMP.



The synthesis of glycosylated *RNase* 1-124 was attempted by using a sequential ligation strategy. The *RNase* fragment 1-39 was divided into thioester 1-25 **F** and the glycosylated thioester 26-39 **D**, where the N-terminal cysteine was selectively protected. The ligation of *RNase* 40-124 **3** with the thioesters Thz-26-39 **15** and Mapoc-26-39 **20** gave the glycopeptides **16** and **21**. After deprotection of **16** with methoxyamine the second ligation was conducted by addition of thioester *RNase* 1-25 **18** yielding the full length *RNase* 1-124 **19** with a nonasaccharide at Asn34. This ligation did not proceed to completion since the majority of the thioester **18** was converted to a methoxyamide.

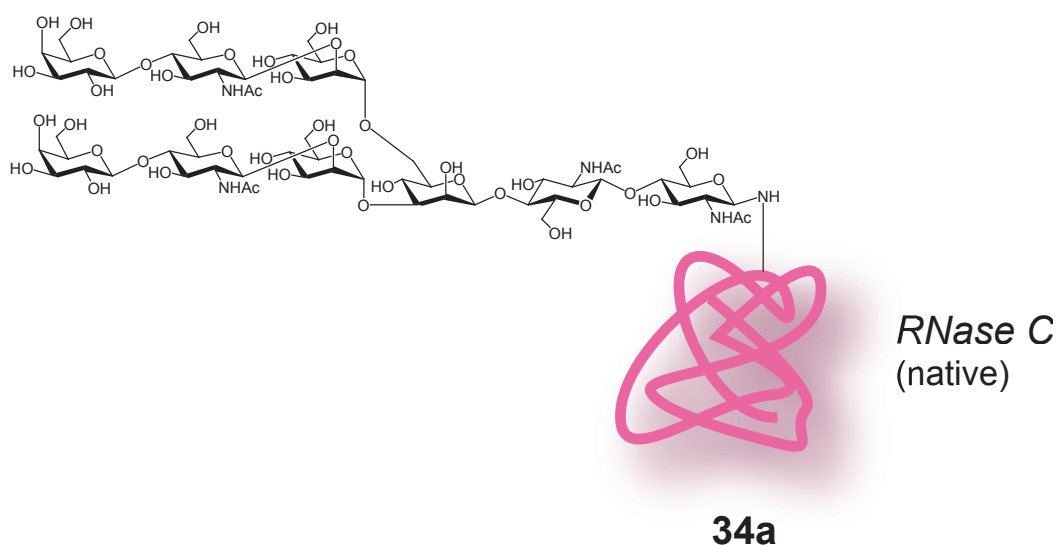


In order to circumvent this problem, the sequential one pot strategy was modified by isolating of the deprotected ligation product. This method was demonstrated starting with the thioesters **23** and **27** giving the ligation products *RNase* Thz-26-124 **24** and **28**. The deprotected glycopeptides were isolated in yields of 44 % and 74 %. These products were allowed to react with thioester **18** to the full length proteins **26** and **30**.



After refolding of the synthetic peptides the *RNase* activity was confirmed by an enzymatic assay. These improvements set the stage for the synthesis of complete *RNase* 1-124 **34** with a nonasaccharide at Asn34. The ligation product of *RNase* 40-124 **3** and glycopeptide thioester *RNase* 26-124 **31** was isolated after deprotection with methoxyamine in 48 % yield (**33**). After elongation of the isolated product with thioester **18** refolding was initiated by adding refolding buffer directly into the ligation solution. Purification by size exclusion chromatography gave the native enzyme **34a** in a yield of 71 %. The *RNase* activity was

assayed and a $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -value of $9.6 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ was found ($RNase A = 5.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $RNase B = 1.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).



In the course of this work a method for the production of protein fragments bearing an N-terminal cysteine was established via recombinant expression. With a recombinant *RNase* fragment and the corresponding thioesters and glycopeptidthioesters the first synthesis of a homogeneous, biologically active *RNase* glycoprotein with a complex N-glycan was achieved. This approach should be valuable for the synthesis of additional glycoproteins of biochemical and therapeutical importance.

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt

Prof. Dr. Carlo Unverzagt

für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die sehr interessante Themenstellung, seine gute Betreuung, die stete Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit, frei arbeiten zu können.

Bei Prof. Dr. *Franz Xaver Schmid*, Prof. Dr. *Mathias Sprinzl*, Prof. Dr. *Rainer Schobert* und Dr. *Holger Dobbek* bedanke ich mich für die Erlaubnis zur Benutzung der Geräte in ihren Laboratorien sowie deren Mitarbeitern für die Hilfestellung.

Dr. *Gundula Voß* gilt mein Dank für die Hilfe bei der Praktikumsbetreuung und bei der Benutzung der UV-Apparatur.

Dr. *Markus Püttner* danke ich für die Einführung in die Molekularbiologie sowie in die gesamten Abläufe des Lehrstuhls Unverzagt.

Anette Behr, *Traudl Herold* und *Silvia Kastner* für die Erledigung der administrativen Aufgaben im Sekretariat.

Dr. *Xaver Schratt*, Dr. *Markus Püttner*, *Steffen Eller* und *Volker Schubert* gilt mein Dank für die Lösung und den Rat bei sämtlichen Computerproblemen.

Dr. *Manuela Schaffrath*, Dr. *Stefano Mezzato*, Dr. *Daniel Varón Silva*, *Claudia Pöhner*, *Christian Heinlein* und *José Nelson Lombana* gebührt mein besonderer Dank für die Bereitstellung der verwendeten Thioester.

Dr. *Xaver Schratt* danke ich für die ausführliche Einführung in die Geheimnisse des Massenspektrometers.

Den technischen Assistenten *Jörg Kastner*, *Volker Schubert* und *Nikolaus Antonakis* gilt mein Dank für das rasche Bestellen von Chemikalien sowie für die Übernahme alltäglicher Laboraufgaben.

Bei Dr. *Stefano Mezzato* und Dr. *Xaver Schratt* bedanke ich mich für das Aufnehmen von Massenspektren zu Beginn dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön an *Sebastian Siebenhaar* und *Steffen Eller* für das Korrekturlesen dieser Arbeit sowie für die konstruktive Kritik.

Dr. *Stefano Mezzato*, Dr. *Daniel Varón Silva* und Dr. *Manuela Schaffrath* danke ich für die Einführung in die HPLC.

Meinen Praktikanten *Kerstin Schindler*, *Stefanie Blommer*, *Mario Liebl*, *Yvonne Brede* und *Sabine Herzog* möchte ich für ihr Interesse und Engagement an meiner Arbeit danken.

Meinen Laborkollegen *Katya Hekimian*, *Bigna Wörsdörfer*, *Olaf Harjes*, Dr. *Manuela Schaffrath* und vor allem *Sebastian Siebenhaar*, *José Nelson Lombana* und Dr. *Markus Püttner* danke ich für die gute Zusammenarbeit und das stets angenehme Laborklima.

Dem gesamten Arbeitskreis und allen nicht erwähnten danke ich für die hervorragende, freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, wobei jeder für alle denkbaren Fragen gerne zur Verfügung stand.

Nicht zuletzt danken möchte ich meinen Eltern und Freunden für die langjährige Unterstützung im Studium und während meiner Promotion. Dank vor allem meiner lieben Freundin Carolin für die Hilfe in jeglicher Hinsicht und für das Ertragen von Launen an schlechteren Arbeitstagen.

9. Literatur

- [1] R. Apweiler, H. Hermjakob, N. Sharon, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1999** 1473, 4.
- [2] R. B. Parekh, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1991**, 1, 750.
- [3] H. Lis, N. Sharon, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 218, 1.
- [4] G. Opdenakker, P. M. Rudd, C. P. Ponting, R. A. Dwek, *FASEB J.* **1993**, 7, 1330.
- [5] A. Helenius, *Mol. Biol. Cell* **1994**, 5, 253.
- [6] A. Helenius, M. Aeby, *Science* **2001**, 291, 2364.
- [7] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 683.
- [8] L. Liu, C. S. Bennett, C.-H. Wong, *Chem. Commun.* **2006**, 1, 21.
- [9] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, 3, 97.
- [10] T. W. Rademacher, R. B. Parekh, R. A. Dwek, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, 57, 785.
- [11] P. M. Rudd, B. P. Morgan, M. R. Wormald, D. J. Harvey, C. W. van den Berg, S. J. Davis, M. A. Ferguson, R. A. Dwek, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1998**, 435, 153.
- [12] G. E. Ritchie, B. E. Moffatt, R. B. Sim, B. P. Morgan, R. A. Dwek, P. M. Rudd, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 305.
- [13] D. Macmillan, C. R. Bertozzi, *Tetrahedron* **2000**, 56, 9515.
- [14] B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 579.
- [15] S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, 57, 957.
- [16] S. T. Ansfield, P. T. Lansbury, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 5560.
- [17] F. Peri, L. Cipolla, B. La Ferla, F. Nicotra, *C. R. Chimie* **2003**, 6, 635.
- [18] Y. L. Liu, G. Hoops, J. K. Coward, *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, 2, 1133.
- [19] R. B. Trimble, A. L. Tarentino, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 1646.
- [20] P. Sears, C. H. Wong, *Science* **2001**, 291, 2344.
- [21] T. Miyazaki, H. Sato, T. Sakakibara, Y. Kajihara, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5678.
- [22] B. Li, H. Song, S. Hauser, L. X. Wang, *Org. Lett.* **2006**, 8, 3081.
- [23] S. Singh, J. Ni, L. X. Wang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 327.
- [24] K. Haneda, T. Inazu, M. Mizuno, K. Yamamoto, *Methods Enzymol.* **2003**, 362, 74.
- [25] L. Wang, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 34.
- [26] S. R. Hamilton, P. Bobrowicz, B. Bobrowicz, R. C. Davidson, H. Li, T. Mitchell, J. H. Nett, S. Rausch, T. A. Stadheim, H. Wischnewski, S. Wildt, T. U. Gerngross,

- Science* **2003**, *301*, 1244.
- [27] T. Durek, C. F. W. Becker, *Biomol. Engineer.* **2005**, *22*, 153.
 - [28] J. S. Tkacz, J. O. Lampen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, *65*, 248.
 - [29] G. B. Karlsson, T. D. Butters, R. A. Dwek, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 570.
 - [30] M. Schnolzer, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *256*, 221.
 - [31] D. R. Englebretsen, B. G. Garnham, D. A. Bergman, P. F. Alewood, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8871.
 - [32] I. Fisch, G. Kunzi, K. Rose, R. E. Offord, *Bioconjug. Chem.* **1992**, *3*, 147.
 - [33] C. F. Liu, J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 6584.
 - [34] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046.
 - [35] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. C. Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776.
 - [36] W. Lu, M. A. Qasim, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8518.
 - [37] D. Bang, S. B. H. Kent, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2588.
 - [38] S. Ueda, M. Fujita, H. Tamamura, N. Fujii, A. Otaka, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1983.
 - [39] D. Bang, B. L. Pentelute, S. H. B. Kent, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4089.
 - [40] T. M. Hackeng, J. H. Griffin, P. E. Dawson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 10068.
 - [41] M. Villain, H. Gaertner, P. Botti, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *17*, 3267.
 - [42] P. Botti, M. R. Carrasco, S. B. H. Kent, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1831.
 - [43] J. Offer, C. N. C. Boddy, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4642.
 - [44] S. Ficht, R. J. Payne, A. Brik, C. H. Wong, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 6079.
 - [45] G. K. Gerd, S. Y. Chen, F. Mao, S. Cressman, S. Traviglia, H. Shao, C. Hunter, D. Low, N. Cagle, M. Carnevali, V. Gueriguian, P. Keogh, H. Porter, S. M. Stratton, M. C. Wiedeke, J. Wilken, J. Tang, J. J. Levy, L. P. Miranda, M. Crnogorac, S. Kalbag, P. Botti, J. S. Horvath, L. Savatski, J. W. Adamson, A. Kung, S. B. H. Kent, *Science* **2003**, *299*, 884.
 - [46] L. Z. Yan, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 526.
 - [47] R. Quaderer, D. Hilvert, *Chem. Commun.* **2002**, *12*, 2620.
 - [48] E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141.
 - [49] B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 9.
 - [50] [a] R. Hirata, Y. Ohsumi, A. Nakano, H. Kawasaki, K. Suzuki, Y. Anraku, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 6726.

- [b] P.M. Kane, C. T. Yamashiro, D. F. Wolcyk, N. Neff, M. Goebel, T. H. Stevens, *Science* **1990**, 250, 651.
- [51] F. B. Perler, E. O. Davis, G. E. Dean, F. S. Gimble, W. E. Jack, N. Neff, C. J. Noren, J. Thorner, M. Belfort, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 1125.
- [52] R. Saldanha, G. Mohr, M. Belfort, A. M. Lambowitz, *FASEB J.* **1993**, 7, 15.
- [53] M. Kawasaki, Y. Satow, Y. Anraku, *FEBS Lett.* **1997**, 412, 518.
- [54] M. Xu, M. W. Southworth, F. B. Mersha, L. J. Hornstra, F. B. Perler, *Cell* **1993**, 75, 1354.
- [55] C. J. Noren, J. Wang, F. B. Perler, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 458.
- [56] M. W. Southworth, J. Benner, F. B. Perler, *EMBO J.* **2000**, 19, 5019.
- [57] M. Belfort, R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 3379.
- [58] M. Q. Xu, F. B. Perler, *EMBO J.* **1996**, 15, 5146.
- [59] M. Southworth, K. Amaya, T. C. Evans, M. Q. Xu, F. B. Perler, *BioTechniques* **1999**, 27, 110.
- [60] T. C. Evans, J. Brenner, M. Q. Xu, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 3923.
- [61] [a] T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, 95, 6705.
[b] K. Severinov, T. W. Muir, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 16205.
- [62] J. Mukhopadhyay, A. N. Kapanidis, V. Mekler, E. Kortkhonjia, Y. W. Ebright, R. H. Ebright, *Cell* **2001**, 106, 453.
- [63] P. H. Hirel, J. M. Schmitter, P. Dessen, G. Fayat, S. Blanquet, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1989**, 86, 8247.
- [64] D. Macmillan, L. Arham, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9530.
- [65] D. A. Erlanson, M. Chytil, G. L. Verdine, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 981.
- [66] T. J. Tolbert, C. H. Wong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2171.
- [67] A. Iakovenko, E. Rostkova, E. Merzlyak, A. M. Hillebrand, N. H. Thoma, R. S. Goody, K. Alexandrov, *FEBS Lett.* **2000**, 468, 155.
- [68] J. A. Camarero, A. Shekhtman, E. Campbell, M. Chlenov, T. M. Gruber, D. A. Bryant, S. A. Darst, D. Cowburn, T. W. Muir, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99, 8536.
- [69] [a] T. J. Tolbert, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5421.
[b] M. Huse, T. W. Muir, L. Xu, Y. G. Chen, J. Kuriyan, J. Massague, *Mol. Cell* **2001**, 8, 671.
- [70] J. A. Camarero, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 5597.

- [71] [a] U. Arnold, M. P. Kinderaker, B. L. Nilsson, B. R. Huck, S. H. Gellmann, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8522.
[b] D. Wang, P. A. Cole, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8883.
- [72] S. Chong, F. B. Mersha, D. G. Comb, M. E. Scott, D. Landry, L. M. Vence, F. B. Perler, J. Benner, R. B. Kucera, C. A. Hirvonen, J. J. Pelletier, H. Paulus, M. Q. Xu, *Gene* **1997**, *192*, 271.
- [73] T. C. Evans Jr., J. Benner, M. Q. Xu, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 18359.
- [74] T. Watanabe, Y. Ito, T. Yamada, M. Hashimoto, S. Sekine, H. Tanake, *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 4465.
- [75] H. Wu, M.-Q. Xu, X.-Q. Liu, *Biochim Biophys Acta* **1998**, *1387*, 422.
- [76] A. Telenti, M. Southworth, F. Alcaide, S. Dangelat, J. Jacobs, R. William. F. B. Perler, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 6378.
- [77] J. W. Dubendorff, F. W. Studier, *J. Mol. Biol.* **1991**, *219*, 45.
- [78] S. Mathys, T. C. Evans, I. C. Chute, H. Wu, S. Chong, J. Benner, X.-Q. Liu, M.-Q. Xu, *Gene* **1999**, *231*, 1.
- [79] S. Chong, G. E. Montello, A. Zhang, E. J. Cantor, W. Liao, M. Xu, J. Benner, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 5109.
- [80] T. H. Plummer Jr., *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 5961.
- [81] D. Fu, L. Chen, R. A. O'Neill, *Carbohydrate Res.* **1994**, *261*, 173.
- [82] L. Gonzales, M. Bruix, T. D. Maurino, T. Feizi, M. Rico, D. Solis, J. J. Barbero, *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *383*, 17.
- [83] J. W. Baynes, F. Wold, *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 6016.
- [84] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemie* **2003**, 794.
- [85] D. Findlay, D. G. Herries, A. P. Mathias, B. R. Rabin, C. A. Ross, *Nature* **1961**, *190*, 781.
- [86] A. L. Murdock, K. Grist, C. H. W. Hirs, *Arch. Biochem. Biophys* **1966**, *114*, 375.
- [87] R. T. Raines, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1045.
- [88] M. Kunitz, *Science* **1940**, *24*, 15.
- [89] C. H. W. Hirs, S. Moore, W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 633.
- [90] H. Yajima, N. Fujii, *Biopolymers* **1981**, *20*, 1859.
- [91] B. Gutte, R. B. Merifield, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 1922.
- [92] D. Y. Jackson, J. Burnier, C. Quan, M. Stanley, J. Tom, J. A. Wells, *Science* **1994**, *266*, 243.

- [93] T. C. Evans, J. Benner, M. Q. Xu, *Prot. Sci* **1998**, 7, 2256.
- [94] K. Witte, P. Sears, R. Martin, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 2114.
- [95] R. L. Williams, S. M. Greene, A. McPherson, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 16020.
- [96] B. A. Bernhard, S. A. Newton, K. Olden, *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 12198.
- [97] P. M. Rudd, H. C. Joao, E. Coghill, P. Fiten, M. R. Saunders, G. Opdenakker, R. A. Dwek, *Biochemistry* **1994**, 33, 17.
- [98] S. E. Luria et al., *Virology* **1960**, 12, 348.
- [99] H. Schägger, G. v. Jagow, *Anal. Biochem.* **1987**, 166, 368.
- [100] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248.
- [101] E. M. Crook, A. P. Mathias, B. R. Rabin, *Biochem. J.* **1960**, 74, 234.
- [102] C. Piontek, *Diplomarbeit*, Universität Bayreuth, **2003**.
- [103] F. A. Marston, *Biochem. J.* **1986**, 240, 1.
- [104] M. M. Carrió, A. Villaverde, *J. of Biotech.* **2002**, 96, 3.
- [105] H. Lilie, E. Schwarz, R. Rudolph, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, 9, 497.
- [106] G. Georgiou, P. Valax, *Methods Enzymol.* **1999**, 309, 48.
- [107] J. G. Thomas, F. Baneyx, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 11141.
- [108] R. R. Kopito, *Trends in Cell Biology* **2000**, 10, 524.
- [109] S. D. Betts, T. M. Hachigian, E. Pichersky, *Plant. Mol. Biol.* **1994**, 26, 117.
- [110] E. Kopetzki, G. Schumacher, P. Buckel, *Mol. Gen. Genet.* **1989**, 216, 149.
- [111] W. F. Studier, A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, J. W. Dubendorff, *Meth. Enzymol.* **1990**, 85, 61.
- [112] M. Li, Z. G. Su, J. C. Janson, *Protein Expr. Purif.* **2004**, 33, 1.
- [113] M. M. Carrió, J. L. Corchero, A. Villaverde, *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, 169, 9.
- [114] J. R. Maachupalli, B. D. Kelley, E. De B. Clark, *Biotechnol. Prog.* **1997**, 13, 144.
- [115] G. Taylor, M. Hoare, D. R. Gray, F. A. O. Marston, *Bio/Technology* **1986**, 4, 553.
- [116] M. Belew, Y. Zhou, W. Wang, L. E. Nyström, J. C. Janson, *Chromatogr. A.* **1994**, 679, 67.
- [117] R. Kuhelj, M. Dolinar, M. Pugercar, V. Turk, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 229, 533.
- [118] B. Fischer, I. Sumner, P. Goodenough, *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, 41, 3.
- [119] P. Hagel, J.J. T. Gerding, W. Fieggen, H. Bloemendal, *Biochim. Biophys. Acta* **1971**, 243, 366.
- [120] E. De B. Clark, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, 9, 157.
- [121] R. Rudolph, *Modern Methods in Protein and Nucleic Acid Research*, 149, Walter de Gruyter, New York **1990**.

- [122] G. Orsini, M. E. Goldberg, *J. Biol. Chem.* **1978**, 253, 34.
- [123] N. Cerletti, G. McMaster, D. Cox, A. Schmitz, B. Meyhack, European Patent Application No. 0433225 A1, **1990**.
- [124] G. Zardeneta, P. M. Horowitz, *Anal. Biochem.* **1994**, 218, 392.
- [125] S. Tandon, P. M. Horowitz, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 4486.
- [126] D. Ambrosius, R. Rudolph, International Patent Application No. WO 92/09622, **1992**.
- [127] E. E. Boeggeman, B. Ramakrishnan, P. K. Qasba, *Annual Conference of the Society for Gycobiology* **2002**, 692.
- [128] J.L. Cleland, C. Hedgepeth, D. I. Wang, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 13327.
- [129] R. Rudolph, S. Fischer, R. Mattes, United States Patent No. 5453363, **1995**.
- [130] T. Arakawa, K. Tsumoto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 304, 148.
- [131] J. L. Cleland, *Protein Folding : In Vivo and In Vitro*, 1., American Chemical Society, Washington, DC, **1993**.
- [132] T. W. Odorzynski, A. Light, *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 4291.
- [133] E. E. DiBella, M. C. Maurer, H. A. Scheraga, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 163.
- [134] A. M. Crestfield, S. Moore, W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* **1963**, 238, 622.
- [135] M. Q. Xu, T. C. Evans Jr., *Methods* **2001**, 24, 257.
- [136] D. J. Smith, E. T. Maggio, G. L. Kenyon, *Biochemistry* **1975**, 14, 766.
- [137] N. Lombana, *Dissertation*, Universität Bayreuth, in Vorbereitung.
- [138] P. E. Dawson, M. J. Churchill, M. R. Ghadiri, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 4325.
- [139] M. Schaffrath, *Dissertation*, Universität Bayreuth, **2003**.
- [140] S. Mezzato, M. Schaffrath, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 1677.
- [141] D. V. Silva, *Dissertation*, Universität Bayreuth, **2006**.
- [142] B. Ayers, U. K. Blaschek, J. A. Camarero, G. J. Cotton, M. Holford, T. W. Muir, *Biopolymers* **1999**, 51, 343.
- [143] J. A. Burns, J. C. Butler, J. Moran, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 2648.
- [144] V. N. R. Pillai, *Synthesis* **1980**, 1.
- [145] J. S. Lim, I. S. Lim, K. S. Lee, D. S. Ahn, Y. S. Lee, S. K. Kim, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 6438.
- [146] R. Huisgen in *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, New York **1984**, 1.
- [147] H. Lin, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 13998.

- [148] C. Pöhner, *Dissertation*, Universität Bayreuth, in Vorbereitung.
- [149] E. C. B. Johnson, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6640.
- [150] C. Heinlein, *Dissertation*, Universität Bayreuth, in Vorbereitung.
- [151] L. Moroder, *J. Peptide Sci.* **2005**, *11*, 187.
- [152] J. R. Knowles, *Science* **1987**, *236*, 1252.
- [153] A. K. Ahmed, W. Schaffer, D. B. Wetlaufer, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 8577.
- [154] J. E. Thompson, F. D. Venegas, R. T. Raines, *Biochemistry* **1994**, *33*, 7408.
- [155] R. Markham, J. D. Smith, *Biochem. J.* **1953**, *52*, 552.
- [156] J. D. Gough, R. H. Williams Jr., A. E. Donofrio, W. J. Lees, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3885.
- [157] R. S. Hodges, R. Merrifield, *J. Biol. Chem.*, **1975**, *250*, 1231.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht diese oder eine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden habe.

Bayreuth, den 14.11.2007

(Christian Piontek)